

▼B**PARTIE C: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ÉCOTOXICITÉ**

TABLE DES MATIÈRES

- C.1. TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES POISSONS
- C.2. *DAPHNIA* SP., ESSAI D'IMMOBILISATION IMMÉDIATE
- C.3. ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE
- C.4. DÉTERMINATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ «FACILE»
- PARTIE I. GÉNÉRALITÉS
- PARTIE II. ESSAI DE DISPARITION DU COD (Méthode C.4-A)
- PARTIE III. ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE (Méthode C.4-B)
- PARTIE IV. ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO₂ (Méthode C.4-C)
- PARTIE V. ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE (Méthode C.4-D)
- PARTIE VI. ESSAI EN FIOLES FERMÉES (Méthode C.4-E)
- PARTIE VII. ESSAI MITI (Méthode C.4-F)
- C.5. DÉGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE
- C.6. DÉGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE
- C.7. DÉGRADATION — DÉGRADATION ABIOTIQUE: HYDROLYSE EN FONCTION DU PH
- C. 8. TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE
- C. 9. BIODÉGRADATION — ESSAI DE ZAHN ET WELLENS
- C. 10. ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS
- C.11. BIODÉGRADATION — BOUES ACTIVÉES: ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION
- C. 12. BIODÉGRADATION — TEST S.C.A.S. MODIFIÉ
- C.13. BIOCONCENTRATION: ESSAI AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU SUR LES POISSONS
- C. 14. POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVÉNILES
- C. 15. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ À COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN
- C.16. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE
- C.17. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT
- C. 18. DÉTERMINATION DE L'ADSORPTION/DÉSORPTION AU MOYEN DE LA MÉTHODE PAR AGITATION

▼B

- C. 19. ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION (K_{OC}) SUR LE SOL ET LES BOUES D'ÉPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)
- C.20. *DAPHNIA MAGNA*, ESSAI DE REPRODUCTION
- C.21. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE
- C.22. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE
- C.23. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LE SOL
- C.24. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LES SYSTÈMES SÉDIMENTAIRES AQUATIQUES
- C.25. MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES — ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION
- C.26. *LEMNA* SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

▼M4

- C.27. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT DOPÉ
- C.28. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT
- C.29. BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO₂ DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)
- C.30. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES

▼B**C.1. TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES POISSONS****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Cet essai a pour objet de déterminer la toxicité aiguë létale d'une substance vis-à-vis des poissons en eau douce. Dans la mesure du possible, il est souhaitable de disposer d'informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance d'essai en vue du choix de la méthode d'essai la plus appropriée (statique, semi-statique ou dynamique), permettant d'assurer des concentrations constantes satisfaisantes de la substance d'essai pendant la période expérimentale.

Des informations supplémentaires (par exemple, la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs, le coefficient de partage n-octanol/eau) doivent être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La toxicité aiguë est l'effet préjudiciable et observable provoqué dans un organisme pendant une courte durée (jours) d'exposition à une substance donnée. Dans le présent essai, la toxicité aiguë est exprimée comme la concentration létale médiane (CL_{50}), c'est-à-dire la concentration qui, dans l'eau, est responsable de la mort de 50 % des poissons d'un lot soumis aux essais pendant une période d'exposition continue qui est à indiquer.

Toutes les concentrations de la substance d'essai sont indiquées en poids par volume (mg/l). Elles peuvent également être exprimées en poids par poids (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

On pourra soumettre à essai une substance de référence afin de démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la réponse de l'espèce utilisée pour l'essai n'a pas varié de façon significative.

Aucune substance de référence n'est indiquée pour cet essai.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Un essai limite peut être effectué à 100 mg/l afin de démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai ajoutée à l'eau, dans une série de concentrations pendant une période de 96 heures. Les mortalités sont notées au moins toutes les 24 heures et les concentrations responsables de la mort de 50 % des poissons (CL_{50}) sont calculées si possible à chaque moment d'observation.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Les critères de qualité doivent s'appliquer à l'essai limite aussi bien qu'à l'essai complet.

La mortalité des témoins ne doit pas dépasser 10 % (ou un poisson, si le nombre d'animaux utilisés pour l'essai est inférieur à 10) à la fin de l'essai.

La concentration en oxygène doit être supérieure à 60 % de la concentration saturante pendant toute la durée de l'essai.

▼B

La concentration de la substance d'essai sera maintenue au moins à 80 % de la concentration initiale pendant toute la durée de l'essai.

Pour les substances qui se dissolvent facilement dans le milieu d'essai et qui donnent des solutions stables, c'est-à-dire les substances qui ne se volatilisent pas, ne se dégradent pas, ne s'hydrolysent pas ou ne s'adsorbent pas en quantité significative, on peut considérer que la concentration initiale est la même que la concentration nominale. Il faudra prouver que la concentration a été maintenue constante pendant la durée de l'essai et que les critères de qualité ont été respectés.

Pour les substances qui sont:

- i) peu solubles dans le milieu d'essai, ou
- ii) susceptibles de former des émulsions ou des dispersions stables, ou
- iii) instables en solution aqueuse,

la concentration initiale retenue sera la concentration mesurée dans la solution (ou si cela s'avère techniquement impossible, mesurée dans la colonne d'eau) au début de l'essai. La concentration doit être mesurée après une période d'équilibrage mais avant l'introduction des organismes d'essai.

Dans tous les cas cités ci-dessus, il y a lieu d'effectuer des mesures supplémentaires au cours de l'essai pour confirmer les concentrations réelles d'exposition et que les critères de qualité ont été respectés.

Le pH ne doit pas varier de plus d'une unité.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Trois types de systèmes peuvent être utilisés:

Essai en statique:

Essai de toxicité au cours duquel n'intervient pas de renouvellement de la solution à étudier (les solutions restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.)

Essai en semi-statique:

Essai sans renouvellement continu de la solution, mais avec un renouvellement régulier de la solution d'essai après des périodes prolongées (par exemple toutes les 24 heures).

Essai en dynamique:

Essai de toxicité au cours duquel l'eau est constamment renouvelée dans les récipients d'essai, le produit chimique soumis à essai étant transporté par l'eau utilisée pour renouveler le milieu d'essai.

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de substance à tester

Les solutions mères de concentration requise sont préparées par dissolution de la substance dans de l'eau désionisée, ou dans de l'eau répondant aux conditions fixées au point 1.6.1.2.

Les concentrations choisies pour l'essai sont préparées par dilution de la solution mère. Si l'on procède à des essais à concentrations élevées, la substance peut être dissoute directement dans l'eau de dilution.

▼B

Les substances ne doivent normalement être testées que jusqu'à la limite de solubilité. Pour certaines substances (par exemple, les substances qui sont peu hydrosolubles, ou qui ont un P_{ow} élevé, ou qui forment dans l'eau une dispersion stable plutôt qu'une véritable solution), il est possible d'utiliser une concentration supérieure à la limite de solubilité de la substance pour être sûr que la concentration soluble/stable maximale a bien été atteinte. Il est toutefois important que cette concentration ne perturbe pas, par ailleurs, les conditions de l'essai (par exemple, formation d'un film de substance à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation de l'eau, etc.).

Dans le cas de substances à faible hydrosolubilité, on peut avoir recours à la dispersion ultrasonique, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants, pour préparer les solutions mères ou également pour faciliter la dispersion de ces substances dans le milieu d'essai. Quand des substances auxiliaires de ce type sont utilisées, toutes les concentrations d'essai doivent contenir la même quantité de substance auxiliaire, et un lot témoin supplémentaire de poissons doit être exposé à la même concentration de substance auxiliaire que celle qui est utilisée dans les séries d'essais. La concentration de tels auxiliaires doit être limitée et ne doit en aucun cas excéder 100 mg/l dans le milieu d'essai.

L'essai doit être effectué sans ajustement du pH. S'il apparaît un changement significatif du pH, il est souhaitable de répéter l'essai avec ajustement du pH et d'en consigner les résultats. Dans ce cas, la valeur du pH de la solution mère doit être ajustée à la valeur du pH de l'eau de dilution à moins que des raisons particulières ne s'y opposent. Pour ce faire, on utilisera de préférence HCl et NaOH. Cet ajustement doit être effectué de manière que la concentration de la substance d'essai dans la solution mère ne soit pas sensiblement modifiée. Si l'ajustement entraîne une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, il faut consigner ces observations dans le procès-verbal.

1.6.1.2. *Eau d'élevage et de dilution*

On peut utiliser de l'eau potable (non contaminée par des concentrations potentiellement nocives de chlore, de métaux lourds ou d'autres substances), de l'eau naturelle de bonne qualité ou de l'eau reconstituée (voir annexe 1). On utilisera de préférence des eaux dont la dureté totale est comprise entre 10 et 250 milligrammes par litre (en $CaCO_3$), et dont le pH est compris entre 6,0 et 8,5.

1.6.2. **Appareillage**

Tout l'appareillage doit être en matériau chimiquement inerte:

- système de dilution automatique (pour essai en dynamique),
- dispositif de mesure de l'oxygène,
- équipement pour la détermination de la dureté de l'eau,
- appareillage approprié pour le contrôle de la température,
- pHmètre.

1.6.3. **Poissons soumis à l'essai**

Les poissons doivent être en bonne santé et ne présenter aucune malformation apparente.

▼B

Les espèces utilisées doivent être choisies sur la base de critères pratiques, tels que leur disponibilité toute l'année, leur facilité d'entretien, leur commodité pour l'essai, leur sensibilité relative aux produits chimiques et tous facteurs significatifs sur le plan économique, biologique ou écologique. Dans le choix des espèces de poissons, il faut également prendre en considération la nécessité de pouvoir comparer les résultats et l'harmonisation internationale existante (référence 1).

Une liste des espèces de poissons recommandées pour la réalisation de cet essai figure à l'annexe 2; le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel sont les espèces à utiliser de préférence.

1.6.3.1. *Élevage*

Les poissons soumis à l'essai doivent provenir de préférence d'un seul et même lot, dont les individus ont la même longueur et le même âge. Ils doivent être conservés pendant au moins 12 jours dans les conditions suivantes:

charge biologique:

appropriée au système utilisé (avec recirculation ou en dynamique) et aux espèces de poissons,

eau:

voir point 1.6.1.2,

lumière:

photopériode de 12 à 16 heures par jour,

concentration en oxygène dissous:

au moins 80 % de la saturation en air,

alimentation:

quotidienne ou trois fois par semaine, avec arrêt de 24 heures avant le début de l'essai.

1.6.3.2. *Mortalité*

Après une période d'adaptation de 48 heures, enregistrer les morts et appliquer les critères suivants:

— mortalité en 7 jours supérieure à 10 % de la population:

rejet de l'ensemble du lot,

— mortalité en 7 jours comprise entre 5 et 10 % de la population:

prolonger la période d'observation pendant 7 jours.

Si l'on ne constate aucun autre cas de mortalité, le lot est acceptable, sinon, il doit être rejeté,

— mortalité en 7 jours inférieure à 5 % de la population:

acceptation du lot.

1.6.4. **Adaptation**

Les poissons doivent être maintenus pendant au moins 7 jours avant leur utilisation dans les mêmes conditions que celles de l'essai (eau et température).

▼B**1.6.5. Mode opératoire**

Avant l'essai définitif, on pourra procéder à un essai visant à déterminer l'intervalle de concentrations à utiliser lors de l'essai définitif.

Procéder, en plus de la série d'essais, à un essai témoin sans substance à étudier et, le cas échéant, à un essai témoin contenant le produit auxiliaire.

En fonction des propriétés physiques et chimiques de la substance à étudier, on choisira une méthode appropriée statique, semi-statique ou dynamique, qui réponde aux critères de qualité.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai dans les conditions suivantes:

- durée: 96 heures,
- nombre d'animaux: au moins 7 par concentration,
- récipients: d'une capacité appropriée, en fonction de la charge biologique recommandée,
- charge biologique: charge maximale recommandée pour l'essai statique ou semi-statique: 1,0 gramme par litre; pour les essais dynamiques, une charge plus élevée peut être acceptable,
- concentrations d'essai: au moins cinq concentrations qui diffèrent d'un facteur constant n'excédant pas 2,2 et couvrent, dans la mesure du possible, l'intervalle de mortalité de 0 à 100 %,
- eau: voir point 1.6.1.2,
- lumière: photopériode de 12 à 16 heures par jour,
- température: convenant à l'espèce choisie (annexe 2), mais constante à ± 1 °C près, quel que soit le système d'essai,
- concentration en oxygène dissous: au moins 60 % de la concentration saturante en air à la température choisie,
- nourriture: aucune.

Les poissons sont examinés après les 2 à 4 premières heures et au moins à intervalles de 24 heures. Ils sont considérés comme morts si le fait de toucher le pédoncule caudal ne produit aucune réaction et si aucun mouvement respiratoire n'est visible. Les poissons morts sont éliminés à chaque observation et les mortalités enregistrées. Les anomalies visibles (par exemple, perte d'équilibre, perturbations au niveau de la nage, des fonctions respiratoires, de la pigmentation, etc.) seront consignées.

Les mesures du pH, de l'oxygène dissous et de la température doivent être effectuées quotidiennement.

Essai limite

Un essai limite peut être effectué à une concentration de 100 mg/l, en suivant les procédures décrites dans cette méthode d'essai, afin de montrer que la CL₅₀ est supérieure à cette concentration.

Si la nature de la substance est telle qu'il est impossible d'obtenir une concentration de 100 mg/l dans l'eau d'essai, l'essai limite doit être effectué à une concentration égale à la solubilité de la substance (ou à la concentration maximale formant une dispersion stable) dans le milieu utilisé (voir également le point 1.6.1.1).

▼B

L'essai limite doit être effectué avec 7 à 10 poissons, et avec un nombre identique dans le(s) lot(s) témoin(s). (Selon la théorie binomiale, lorsque l'on utilise 10 poissons avec une mortalité nulle, il y a 99,9 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée dans l'essai limite. Avec 7, 8 ou 9 poissons et une mortalité nulle, il y a 99 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée.)

En cas de mortalité, il convient d'effectuer un essai complet. Si des effets sublétaux sont observés, ceux-ci doivent être consignés.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Reporter, sur un papier log-probit, le pourcentage de mortalité pour chaque période d'exposition recommandée (24, 48, 72 et 96 heures) en fonction de la concentration.

Pour chaque temps d'observation, estimer, lorsque cela est possible, la CL_{50} et l'intervalle de confiance ($p = 0,05$) par les méthodes classiques; les valeurs obtenues doivent être arrondies à un ou deux (maximum) chiffres significatifs (exemples de nombres arrondis à deux chiffres: 170 pour 173,5; 0,13 pour 0,127; 1,2 pour 1,21).

Dans le cas où la pente de la courbe de pourcentage en fonction de la concentration est trop forte pour permettre de calculer la CL_{50} , il suffit de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 2,2 donnent 0 et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50} .

Si l'on constate que la stabilité ou l'homogénéité de la substance d'essai ne peut pas être maintenue, cette observation doit être mentionnée et les résultats seront interprétés avec prudence.

3. RÉSULTATS

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

- des informations sur les poissons soumis à essai (nom scientifique, souche, fournisseur, tout prétraitement, taille et nombre utilisé pour chaque concentration d'essai),
- origine et principales caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, température),
- dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai,
- concentration de tout produit auxiliaire,
- liste des concentrations utilisées et toute information disponible sur la stabilité de la substance d'essai dans la solution d'essai à ces concentrations,
- si on procède à des analyses chimiques, méthodes utilisées et résultats,
- éventuellement, résultats de l'essai limite,
- motifs du choix et description détaillée de la méthode utilisée (par exemple système statique, semi-statique, taux d'administration, taux de renouvellement, aération ou non, charge en poisson, etc.),

▼B

- description du matériel d'essai,
- régime d'éclairage,
- concentration en oxygène dissous, pH et température des solutions d'essai toutes les 24 heures,
- preuves que les critères de qualité ont été respectés,
- tableau contenant la mortalité cumulée pour chaque concentration et pour le témoin (et, au besoin, le témoin contenant la substance auxiliaire) à chaque temps d'observation recommandé,
- représentation graphique du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration à la fin de l'essai,
- si possible, valeurs de la CL₅₀ pour chacun des temps d'observation recommandés (avec l'intervalle de confiance à 95 %),
- méthodes statistiques employées pour déterminer les valeurs de la CL₅₀,
- si une substance de référence est utilisée, les résultats obtenus,
- la concentration d'essai la plus élevée qui ne cause pas de mortalité pendant la durée de l'essai,
- la concentration d'essai la plus basse qui cause une mortalité de 100 % des poissons pendant la durée de l'essai.

4. **RÉFÉRENCES**

- (1) OCDE, Paris, 1981, ligne directrice n° 203, décision du Conseil C(81) 30 final et mises à jours.
- (2) AFNOR — NFT 90-303, juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Brachydanio rerio* — Méthode statique et dynamique.
- (3) AFNOR — NFT 90-305, juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Salmo gairdneri* — Méthode statique et dynamique.
- (4) ISO 7346/1/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
- (5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.
- (6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).
- (7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- (8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- (9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- (10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

- (11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- (12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- (13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, p. 99.
- (16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.
- (17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, p. 793-821.
- (18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, p. 3-32.
- (19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, p. 65-84.
- (20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W.A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

▼B*Annexe I***Eau reconstituée***Exemple d'eau de dilution appropriée*

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau doit être une eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau désionisée d'une conductivité inférieure à 5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

L'appareillage pour la distillation de l'eau ne doit contenir aucun élément en cuivre.

Solutions mères

| | |
|---|---------|
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O (chlorure de calcium dihydraté): | 11,76 g |
| dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O (sulfate de magnésium heptahydraté): | 4,93 g |
| dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre | |
| NaHCO ₃ (hydrogénocarbonate de sodium): | 2,59 g |
| dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre | |
| KCl (chlorure de potassium): | 0,23 g |
| dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre | |

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions mères et compléter à 1 litre avec de l'eau.

Aérer jusqu'à saturation en oxygène dissous lqy.

Le pH doit être de $7,8 \pm 0,2$.

Si nécessaire, ajuster le pH avec NaOH (hydroxyde de sodium) ou HCl (acide chlorhydrique).

L'eau de dilution ainsi préparée est laissée au repos pendant environ 12 heures et ne doit pas être aérée ultérieurement.

La somme des ions Ca et Mg dans cette solution est égale à 2,5 mmol/l. Le rapport des ions Ca:Mg est de 4:1, celui des ions Na:K de 10:1. L'alcalinité totale de cette solution est égale à 0,8 mmol/l.

Les déviations éventuelles dans la préparation de l'eau de dilution ne doivent pas modifier la composition ou les propriétés de cette eau.

▼B

Annexe 2

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

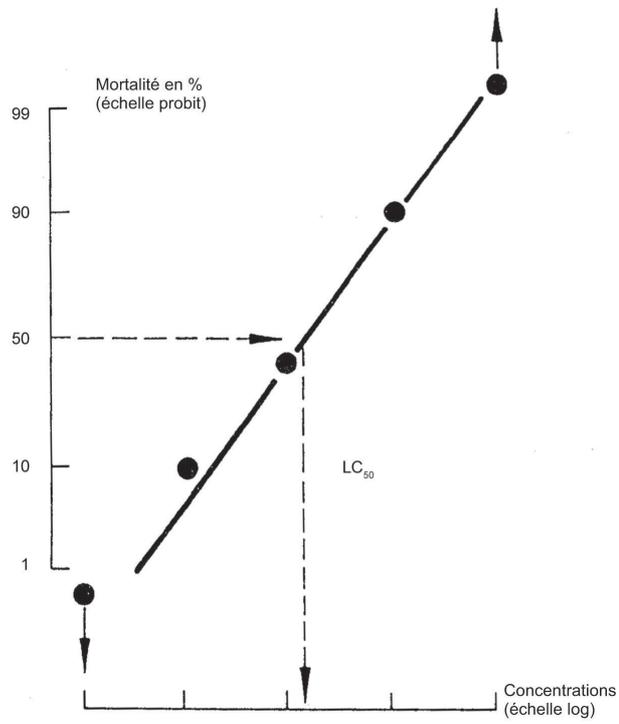
| Espèces recommandées | Intervalles des températures d'essai recommandé (°C) | Longueur totale recommandée de l'animal soumis à l'essai (cm) |
|---|--|---|
| <i>Brachydanio rerio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré | 20 à 24 | 3,0 ± 0,5 |
| <i>Pimephales promelas</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Rafinesque) Tête de boule | 20 à 24 | 5,0 ± 2,0 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus 1758) Carpe commune | 20 à 24 | 6,0 ± 2,0 |
| <i>Oryzias latipes</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) <i>Cyprinodonti-dae</i> (Tomminck et Schlegel 1850) Nedaka | 20 à 24 | 3,0 ± 1,0 |
| <i>Poecilia reticulata</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Peters 1859) Guppy | 20 à 24 | 3,0 ± 1,0 |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (<i>Teleostei, Centrarchidae</i>) Rafinesque Linnaeus 1758) Crapet arlequin | 20 à 24 | 5,0 ± 2,0 |
| <i>Onchorhynchus mykiss</i> (<i>Teleostei, Salmonidae</i>) (Walbaum 1988) Truite arc-en-ciel | 12 à 17 | 6,0 ± 2,0 |
| <i>Leuciscus idus</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus 1758) Ide mélanote | 20 à 24 | 6,0 ± 2,0 |

Approvisionnement

Les poissons mentionnés ci-dessus sont faciles à élever et/ou largement disponibles pendant toute l'année. Ils peuvent se reproduire et se développer soit dans des exploitations piscicoles, soit en laboratoire, dans des conditions sanitaires contrôlées. L'animal soumis à essai doit être sain et d'origine connue. Ces poissons sont disponibles partout dans le monde.

▼B

Annexe 3

Exemple de courbe de pourcentage de mortalité en fonction de la concentrationExemple de détermination de la LC_{50} sur papier log-probit

▼B**C.2. DAPHNIA SP., ESSAI D'IMMOBILISATION IMMÉDIATE****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 202 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode décrit un essai de toxicité aiguë visant à évaluer les effets des substances chimiques sur des daphnies. Les méthodes d'essai existantes ont été utilisées dans toute la mesure du possible (1) (2) (3).

1.2. DÉFINITIONS

Les définitions suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode:

CE₅₀: estimation de la concentration capable d'immobiliser 50 % des daphnies après une période d'exposition définie. Si une autre définition est utilisée, elle doit être indiquée avec sa référence.

Immobilisation: les animaux incapables de nager au bout de 15 secondes après agitation douce du récipient utilisé pour l'essai sont considérés comme immobiles (même s'ils sont toujours capables de bouger leurs antennes).

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

De jeunes daphnies, âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai à différentes concentrations pendant une période de 48 heures. L'immobilisation est enregistrée à 24 et à 48 heures, puis comparée à des valeurs de contrôle. Les résultats sont analysés pour calculer la CE₅₀ à 48 heures (voir point 1.2 pour les définitions). La détermination de la CE₅₀ à 24 heures est facultative.

1.4. INFORMATION CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. De même, il faut disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser la substance dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus. Les informations utiles comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau ou à la lumière, le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

Remarque: Un document d'orientation (4) fournit des indications pour les substances qu'il est difficile de tester à cause de leurs propriétés physico-chimiques.

1.5. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il est possible de déterminer la CE₅₀ d'une substance de référence, de manière à s'assurer que les conditions d'essai sont fiables. Les toxiques utilisés dans les essais tournants internationaux (1) (5) sont recommandés à cet effet (1). Les essais avec une substance de référence doivent être effectués de préférence tous les mois et au moins deux fois par an.

(1) Les résultats de ces essais interlaboratoires, ainsi qu'un corrigendum technique à l'ISO 6341, donnent une CE₅₀ 24 h du dichromate de potassium (K₂Cr₂O₇) comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITÈRES DE QUALITÉ

Pour qu'un essai soit valide, les critères de performance suivants s'appliquent:

- pas plus de 10 % des daphnies ne doivent être immobilisées dans le groupe témoin, y compris le témoin contenant l'agent solubilisant,
- la concentration d'oxygène dissous à la fin de l'essai doit être \geq 3 mg/l dans les récipients d'essai et les récipients témoins.

Remarque: Pour le premier critère, pas plus de 10 % des daphnies du témoin ne doivent être immobilisées ou montrer d'autres signes de défaillance ou de stress, tels qu'une décoloration ou un comportement inhabituel (piégées à la surface de l'eau, par exemple).

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. **Appareillage**

Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai doivent être intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. Les récipients d'essai sont le plus souvent des éprouvettes ou des béchers en verre. Avant chaque usage, ils doivent être nettoyés selon les procédures de laboratoire standard. Afin de réduire la déperdition d'eau par évaporation et de prévenir l'entrée de poussière dans les solutions, les récipients d'essai doivent être couverts. Les essais sur les substances volatiles doivent être réalisés dans des récipients complètement remplis et fermés, suffisamment grands pour éviter que la concentration d'oxygène ne soit trop faible ou ne devienne un facteur limitant (voir point 1.6 et premier paragraphe du point 1.8.3).

Par ailleurs, tout ou partie des équipements suivants est nécessaire: un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume); un pH-mètre; un thermostat adéquat; un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique totale (COT); un appareil pour déterminer la demande chimique en oxygène (DCO); un appareil pour déterminer la dureté de l'eau, etc.

1.7.2. **Organisme d'essai**

L'espèce à utiliser de préférence dans cet essai est *Daphnia magna* Straus, mais d'autres espèces de *Daphnia* peuvent aussi être utilisées (*Daphnia pulex*, par exemple). Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de 24 heures au maximum, et, pour réduire la variabilité, il est fortement recommandé qu'ils ne proviennent pas d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Tous les organismes utilisés dans un essai donné doivent provenir de cultures établies à partir d'un même lot de daphnies. Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les daphnies, il convient de leur laisser une période d'acclimatation avant l'essai. En l'occurrence, il convient de les maintenir dans de l'eau de dilution à la température de l'essai pendant au moins 48 heures avant le début de l'essai.

▼B**1.7.3. Eau d'acclimatation et de dilution**

On peut utiliser, comme eau d'acclimatation et de dilution, de l'eau naturelle (eau de surface ou eau souterraine), de l'eau reconstituée ou de l'eau du robinet déchlorée, du moment que les daphnies y survivent sans montrer de signes de stress pendant toute la durée de l'élevage, de l'acclimatation et de l'essai. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable données dans la liste de l'annexe 1 convient pour cet essai. Sa qualité doit rester constante tout au long de l'essai. Les eaux reconstituées peuvent être composées d'eau distillée ou désionisée auxquelles on ajoute certaines quantités spécifiques de réactifs de qualité pour analyse. Des exemples d'eau reconstituée sont donnés dans les documents (1) (6) et dans l'annexe 2. Il convient de noter que les milieux contenant des agents chélatants connus, tels que les milieux M4 et M7 présentés dans l'annexe 2, doivent être évités pour les essais de substances contenant des métaux. Le pH doit être compris entre 6 et 9. Une dureté comprise entre 140 et 250 mg/l (en CaCO₃) est recommandée pour les *Daphnia magna*, mais des duretés inférieures conviennent également pour d'autres espèces de *Daphnia*. L'eau de dilution peut être aérée avant utilisation dans l'essai, de façon que la concentration de l'oxygène dissous atteigne la saturation.

Lorsque de l'eau naturelle est utilisée, les paramètres de sa qualité doivent être mesurés au moins deux fois par an, ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées (voir point précédent et annexe 1). Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple) doivent être mesurés. Si de l'eau du robinet déchlorée est utilisée, il est souhaitable de procéder chaque jour à une analyse de sa teneur en chlore. Si l'eau de dilution provient d'une eau souterraine ou d'une eau de surface, sa conductivité et son carbone organique total (COT) ou sa demande chimique en oxygène (DCO) doivent être mesurés.

1.7.4. Solutions d'essai

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. De préférence, les solutions mères doivent être préparées par dissolution de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Le recours à des solvants, émulsifiants ou dispersants doit être évité dans toute la mesure du possible. Néanmoins, ces additifs sont parfois nécessaires pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Le document guide (4) donne des informations sur le choix des solvants, émulsifiants et dispersants appropriés. En tout cas, la substance d'essai dans la solution d'essai ne doit pas excéder sa limite de solubilité dans l'eau de dilution.

L'essai doit être mené sans ajustement du pH. Si le pH ne reste pas dans la plage comprise entre 6 et 9, alors il convient de procéder à un deuxième essai, en ajustant le pH de la solution mère à celui de l'eau de dilution avant d'ajouter la substance d'essai. Lors de l'ajustement du pH, il faut que la concentration de la solution mère ne soit quasiment pas modifiée, ni qu'aucune réaction chimique, ni précipitation de la substance d'essai ne soit provoquée. De préférence, il convient d'employer du HCl et du NaOH.

▼B

1.8. PROCÉDURE

1.8.1. **Conditions d'exposition**1.8.1.1. *Témoins et groupes d'essai*

On remplit les récipients d'essai avec les volumes voulus d'eau de dilution et de solutions de la substance d'essai. Le rapport air/volume d'eau à l'intérieur des récipients doit être identique pour les groupes témoins et les groupes d'essai. On place ensuite les daphnies dans les récipients. Il faut utiliser, pour chaque concentration d'essai et pour les témoins, au moins 20 animaux, répartis de préférence en quatre groupes de cinq animaux. Un volume d'au moins 2 ml de solution d'essai doit être prévu pour chaque animal (soit un volume de 10 ml pour cinq daphnies par récipient). Si la concentration de la substance d'essai n'est pas stable, un système de renouvellement semi-statique ou continu peut être utilisé pour l'essai.

Parallèlement aux séries traitées, il faut tester une série de témoins de l'eau de dilution et, le cas échéant, une série de témoins contenant l'agent solubilisant (solvant) en quantité utilisée dans les séries traitées.

1.8.1.2. *Concentrations d'essai*

À moins qu'une information ne soit déjà disponible sur la toxicité de la substance d'essai, un essai peut le cas échéant être mené pour déterminer la plage des concentrations de l'essai définitif. À cette fin, les daphnies sont exposées à une série de concentrations de la substance d'essai largement espacées. Cinq daphnies sont exposées à chaque concentration pendant 48 heures ou moins. Aucun essai identique n'est nécessaire. La période d'exposition peut être raccourcie (24 heures ou moins, par exemple) s'il est possible d'obtenir plus rapidement les données voulues.

Il faut utiliser au moins cinq concentrations formant une série géométrique de concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 2,2. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. De préférence, la concentration la plus élevée doit provoquer 100 % d'immobilisation, et la moins élevée ne doit donner lieu à aucun effet observable.

1.8.1.3. *Conditions d'incubation*

La température doit être comprise entre 18 et 22 °C, et, pour chaque essai, elle doit être constante à ± 1 °C. Une alternance de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité est recommandée. Une obscurité complète est également acceptable, en particulier pour les substances d'essai instables à la lumière.

Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai. L'essai est mené sans ajustement du pH. Les daphnies ne doivent pas être nourries pendant l'essai.

1.8.1.4. *Durée*

La durée de l'essai est de 48 heures.

1.8.2. **Observations**

À échéances de 24 et 48 heures après le début de l'essai, la présence de daphnies immobiles doit être contrôlée dans chaque récipient d'essai (voir définitions au point 1.2). Outre l'immobilité, tout comportement ou signe anormal doit être signalé.

▼B**1.8.3. Mesures analytiques**

L'oxygène dissous et le pH sont mesurés au début et à la fin de l'essai dans les récipients témoins et dans ceux contenant la concentration de la substance d'essai la plus élevée. La concentration de l'oxygène dissous dans les témoins doit être conforme au critère de validité (voir le point 1.6). Normalement, le pH ne doit pas varier de plus de 1,5 unité au cours d'un essai. En règle générale, on mesure la température dans les récipients témoins ou la température ambiante, et de préférence il y a lieu de l'enregistrer en continu au cours de l'essai ou, au minimum, au début et à la fin de l'essai.

La concentration de la substance d'essai doit être mesurée, au minimum, dans les récipients contenant la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, au début et à la fin de l'essai (4). Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si l'on peut démontrer de façon suffisamment convaincante que la concentration de la substance d'essai a été maintenue tout au long de l'essai de manière satisfaisante dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, alors les résultats peuvent être fondés sur les valeurs nominales ou les valeurs initiales mesurées.

1.9. ESSAI LIMITE

Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente méthode, un essai limite peut être conduit à 100 mg/l de substance d'essai ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus basse), de façon à démontrer que la CE_{50} est supérieure à cette concentration. L'essai limite doit être mené sur 20 daphnies (de préférence réparties en quatre groupes de cinq), avec un nombre équivalent d'animaux dans les récipients témoins. Si des daphnies sont immobilisées, il y a lieu de mener une étude complète. Tout comportement anormal observé doit être enregistré.

2. RÉSULTATS

Les résultats doivent être synthétisés dans des tableaux mettant en évidence, pour chaque groupe d'essai et chaque témoin, le nombre de daphnies utilisées et l'immobilisation à chaque observation. En outre, une représentation graphique doit montrer les pourcentages immobilisés à 24 et 48 heures par concentration d'essai. Les résultats sont analysés au moyen des méthodes statistiques appropriées (analyse probit, par exemple) permettant de calculer les pentes des courbes et la CE_{50} avec des limites de confiance de 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Lorsque les données obtenues ne se prêtent pas au calcul de la CE_{50} par les méthodes standard, on doit utiliser la concentration la plus élevée qui ne donne aucune immobilisation et la concentration la plus faible qui donne 100 % d'immobilisation pour en déduire une valeur approximative de la CE_{50} (en prenant la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

3. RAPPORT**3.1. RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

▼B

- données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai:

- source et espèce de *Daphnia*, fournisseur (s'il est connu) et conditions de culture appliquées (notamment source, type et quantités de nourriture, fréquence de l'alimentation).

Conditions d'essai:

- description des récipients d'essai: type et volume des récipients, volume de la solution, nombre de daphnies par récipient, nombre de récipients d'essai (essais identiques) par concentration,
- méthodes de préparation des solutions mères et d'essai, et notamment utilisation éventuelle de tout solvant ou agent dispersant, et concentrations utilisées,
- détails concernant l'eau de dilution: source et caractéristiques (pH, dureté, rapport Ca/Mg, rapport Na/K, alcalinité, conductivité, etc.); le cas échéant, composition de l'eau reconstituée,
- conditions d'incubation: température, intensité et périodicité de la lumière, oxygène dissous, pH, etc.

Résultats:

- nombre et pourcentage de daphnies immobilisées ou ayant manifesté un effet adverse quelconque (y compris un comportement anormal) parmi les témoins et les groupes traités à chaque période d'observation, et une description de la nature des effets constatés,
- résultats et date de l'essai effectué avec une substance de référence, le cas échéant,
- concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai; l'efficacité de la méthode de récupération et la limite de détermination doivent également être précisées,
- toutes les mesures physico-chimiques (température, pH et oxygène dissous) effectuées au cours de l'essai,
- CE₅₀ à 48 heures (immobilisation) avec les intervalles de confiance et les graphiques du modèle utilisé pour le calcul, les pentes des courbes dose-effet et leur erreur standard; procédures statistiques utilisées pour déterminer la CE₅₀ (ces informations doivent aussi être précisées pour l'immobilisation à 24 heures lorsque les mesures ont été effectuées),
- explication de tout écart par rapport à la méthode d'essai, et conséquences éventuelles sur les résultats de l'essai.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (21) ISO 6341 (1996). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë. Troisième édition, 1996.
- (22) EPA OPPTS 850.1010 (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

- (23) Environnement Canada (1996). Méthode d'essai biologique. Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp. EPS 1/RM/1 I. Environnement Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- (24) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.
- (25) Commission des Communautés européennes. Étude D8369 (1979). Programme d'essais interlaboratoires concernant l'étude de l'écotoxicité d'une substance chimique vis-à-vis de la *Daphnia*.
- (26) OCDE, ligne directrice pour les essais de produits chimiques. Ligne directrice 211: *Daphnia magna*, essai de reproduction, adoptée en septembre 1998.
- (27) Stephan, C.E. (1977). Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials, p. 65-84.
- (28) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B*Annexe I***QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE
DILUTION ACCEPTABLE**

| Substance | Concentration |
|--|---------------|
| Particules | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Total des pesticides organophosphorés | < 50 ng/l |
| Total des pesticides organochlorés plus biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |



Annexe 2

EXEMPLES D'EAU D'ESSAI RECONSTITUÉE ACCEPTABLE**Eau d'essai ISO (1)**

| Solutions mères (substance unique) | | Pour préparer l'eau reconstituée, ajouter les volumes suivants de solutions mères à 1 litre d'eau (*) |
|---|--------------------------------------|---|
| Substance | Quantité ajoutée à 1 litre d'eau (*) | |
| Chlorure de calcium CaCl ₂ , 2H ₂ O | 11,76 g | 25 ml |
| Sulfate de magnésium MgSO ₄ , 7H ₂ O | 4,93 g | 25 ml |
| Bicarbonate de sodium NaHCO ₃ | 2,59 g | 25 ml |
| Chlorure de potassium KCl | 0,23 g | 25 ml |

(*) Eau de pureté adéquate, par exemple, eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse, de conductivité de préférence inférieure à 10 µS.cm⁻¹.

Milieux Elendt M7 et M4**Acclimatation aux milieux Elendt M4 et M7**

Certains laboratoires ont rencontré des difficultés pour transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. Les périodes d'acclimatation peuvent prendre jusqu'à un mois.

Préparation*Éléments en traces*

Différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. À partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir:

| Solution(s) mère(s) I (substance unique) | Quantité ajoutée à l'eau (mg/l) | Concentration (par rapport au milieu M4) | Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l) | |
|--|---------------------------------|--|--|------|
| | | | M4 | M7 |
| H ₃ BO ₃ | 57 190 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 7 210 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |

▼B

| Solution(s) mère(s) I (substance unique) | Quantité ajoutée à l'eau (mg/l) | Concentration (par rapport au milieu M4) | Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l) | |
|---|---------------------------------|--|--|------|
| | | | M4 | M7 |
| RbCl | 1 420 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| SrCl ₂ .6H ₂ O | 3 040 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1 230 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| CuCl ₂ .2H ₂ O | 335 | 20 000 fois | 1,0 | 0,25 |
| ZnCl ₂ | 260 | 20 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 200 | 20 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| KI | 65 | 20 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| Na ₂ SeO ₃ | 43,8 | 20 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| NH ₄ VO ₃ | 11,5 | 20 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 5 000 | 2 000 fois | – | – |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 1 991 | 2 000 fois | – | – |

Les solutions de Na₂EDTA et de FeSO₄ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées.

Cela donne:

| | | | | |
|---------------------|--|------------|------|-----|
| 2 l solution Fe-EDT | | 1 000 fois | 20,0 | 5,0 |
|---------------------|--|------------|------|-----|

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, de macronutriments et de vitamines, de la façon suivante:

| | Quantité ajoutée à l'eau (mg/l) | Concentration (par rapport au milieu M4) | Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l) | |
|--|---------------------------------|--|---|-----|
| | | | M4 | M7 |
| Solution mère II (combinaison de substances en traces) | | 20 fois | 50 | 50 |
| Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution) | | | | |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 293 800 | 1 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 246 600 | 2 000 fois | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000 fois | 0,1 | 0,1 |
| NaHCO ₃ | 64 800 | 1 000 fois | 1,0 | 1,0 |
| Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O | 50 000 | 5 000 fois | 0,2 | 0,2 |
| NaNO ₃ | 2 740 | 10 000 fois | 0,1 | 0,1 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 430 | 10 000 fois | 0,1 | 0,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 840 | 10 000 fois | 0,1 | 0,1 |

▼B

| | Quantité ajoutée à l'eau (mg/l) | Concentration (par rapport au milieu M4) | Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l) | |
|--------------------------------------|---------------------------------|--|---|-----|
| | | | M4 | M7 |
| Solution mère de vitamines combinées | — | 10 000 fois | 0,1 | 0,1 |

La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:

| | | | | |
|--------------------------|-----|-------------|--|--|
| Chlorhydrate de thiamine | 750 | 10 000 fois | | |
| Cyanocobalamine (B12) | 10 | 10 000 fois | | |
| Biotine | 7,5 | 10 000 fois | | |

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

NB: Afin d'éviter que les sels ne se précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 ml d'eau désionisée et amener le volume à 1 litre.

NB: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, p. 25-33.

▼ **M1****C.3. ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE****1. MÉTHODE**

La présente méthode est équivalente à la ligne directrice TG 201 (2006) (1) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes d'essai sont régulièrement revues et mises à jour en fonction des progrès scientifiques. En ce qui concerne la méthode d'essai C.3, il s'est avéré nécessaire d'ajouter des espèces et de la remanier conformément aux exigences nouvelles en matière d'évaluation des dangers et de classification des substances chimiques. Cette révision s'est appuyée sur la somme des informations recueillies, depuis l'adoption initiale, qui résultent d'une solide expérience concrète, des avancées scientifiques dans le domaine des études de toxicité sur les algues et d'une longue pratique réglementaire.

1.2. DÉFINITIONS

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de cette méthode d'essai.

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population, exprimé en fonction d'un volume donné, par exemple en mg d'algues/litre de solution d'essai. D'habitude la biomasse est définie comme une masse, mais dans cet essai, le terme «biomasse» fait référence à une masse par unité de volume. Remarquons également que, dans cet essai, la biomasse est en général mesurée indirectement, par la numération des cellules, la fluorescence, etc., si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces mesures de substitution.

Coefficient de variation: mesure sans dimension de la variabilité d'un paramètre, définie par le rapport de l'écart-type à la moyenne. Il s'exprime également en pourcentage. Le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique moyen des expériences identiques du groupe témoin se calcule comme suit:

1. calculer le coefficient de variation (en %) du taux de croissance spécifique moyen en fonction des taux de croissance quotidiens (section par section) pour chaque expérience identique;
2. calculer la valeur moyenne de toutes les valeurs calculées au point 1, afin d'obtenir le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique quotidien (section par section) des cultures témoins identiques.

CE_x: concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance des organismes d'essai durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_p, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, lorsqu'il s'agit du rendement.

Milieu de croissance: milieu de culture synthétique complet dans lequel les algues se développent lorsqu'elles sont exposées à la substance d'essai, celle-ci étant généralement dissoute dans le milieu d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

▼ M1

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable étudiée: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans cette méthode d'essai, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de la mesure directe de la biomasse ou de sa mesure indirecte d'après l'un des paramètres de substitution mentionnés précédemment.

Taux de croissance spécifique: variable étudiée correspondant au quotient de la différence des logarithmes népériens d'un paramètre observé (la biomasse, dans cette méthode d'essai) par la période de temps respective.

Rendement: différence entre la valeur d'une variable mesurée à la fin de la période d'exposition et la valeur de cette variable mesurée au début de la période d'exposition, utilisée pour exprimer l'accroissement de biomasse durant l'essai.

1.3. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

Cette méthode d'essai se prête mieux aux substances hydrosolubles qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau. Les substances volatiles, s'adsorbant fortement, colorées ou peu solubles dans l'eau ou les substances susceptibles d'influer sur la disponibilité des nutriments ou des minéraux dans le milieu d'essai appellent éventuellement certaines modifications du procédé décrit (par exemple, un système fermé, le conditionnement des récipients d'essai). Certaines modifications appropriées sont abordées dans les références (2), (3) et (4).

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

Cet essai vise à déterminer les effets d'une substance sur la croissance d'algues microscopiques dulcicoles et/ou de cyanobactéries. Des organismes d'essai en phase de croissance exponentielle sont exposés à la substance d'essai dans des cultures en lots sur une période durant normalement 72 heures. La relative brièveté de l'essai permet néanmoins d'évaluer les effets sur plusieurs générations.

L'effet observé est la réduction de la croissance dans une série de cultures d'algues (unités expérimentales) exposées à différentes concentrations de la substance d'essai. L'effet est évalué en fonction de la concentration d'exposition, en comparaison avec la croissance moyenne d'une série de cultures témoins identiques et non traitées. Afin que les effets toxiques puissent pleinement s'exprimer (sensibilité optimale des cultures), les cultures d'algues sont placées dans des conditions propres à une croissance exponentielle non limitée: éléments nutritifs en suffisance et lumière continue, et ce, sur une période assez longue pour que la réduction du taux de croissance spécifique puisse être mesurée.

▼ M1

La croissance et l'inhibition de la croissance sont quantifiées d'après des mesure de la biomasse algale en fonction du temps. La biomasse des algues est définie en poids sec par volume, par exemple des milligrammes d'algues par litre de solution expérimentale. Le poids sec étant difficile à mesurer, on recourt à d'autres paramètres tels que la numération cellulaire, qui est le plus souvent utilisée, ou encore le volume, la fluorescence et la densité optique cellulaires, etc. Le facteur de conversion du paramètre de substitution mesuré en biomasse doit être connu.

L'effet étudié est l'inhibition de la croissance, exprimée par l'accroissement logarithmique de la biomasse (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage x donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50, %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales, et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple, $C_{50}E_t$).

Pour l'application de cette méthode dans le cadre réglementaire de l'UE, le calcul des résultats doit être fondé sur un taux de croissance spécifique moyen, pour les raisons décrites au point 2.2 ci-dessous. La présente méthode d'essai comporte une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de la période d'exposition et cette valeur au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage x donné d'inhibition du rendement (par exemple, 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales, et exprimée sous la forme C_xE_r (par exemple, $C_{50}E_r$).

En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Les informations sur la substance d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pouvoir d'absorption lumineuse, le pKa et les résultats d'études de transformation, notamment la biodégradabilité dans l'eau.

Il faut connaître l'hydrosolubilité, le coefficient de partage octanol-eau (P_{oc}) et la pression de vapeur de la substance d'essai, et disposer d'une méthode validée pour quantifier la substance dans les solutions expérimentales, méthode dont le rendement de récupération et le seuil de détection seront mentionnés dans le rapport.

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Le procédé expérimental peut être vérifié au moyen de substance(s) de référence telle(s) que le 3,5-dichlorphénol, utilisé dans l'essai tournant international (4). Le dichromate de potassium peut également servir de substance de référence pour les algues vertes. Il est recommandé de mettre une substance de référence à l'essai au moins deux fois par an.

1.7. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les critères de performance suivants:

▼ **M1**

- l'accroissement exponentiel de la biomasse des cultures témoins doit être d'un facteur au moins égal à 16 en l'espace de 72 heures (durée de l'essai), ce qui correspond à un taux de croissance spécifique de $0,92/\text{jour}^{-1}$. Le taux de croissance des espèces les plus fréquemment utilisées est généralement nettement supérieur (voir appendice 1). Ce critère ne sera pas forcément rempli avec les espèces à croissance plus lente que celles énumérées à l'appendice 1. Dans ce cas, il convient d'allonger la durée de l'essai, afin d'obtenir un facteur de multiplication de la croissance au moins égal à 16 dans les cultures témoins, la croissance devant être exponentielle tout au long de l'essai. La durée de l'essai peut être ramenée à au moins 48 heures pour maintenir une croissance exponentielle non limitée durant l'essai, pourvu que le facteur de multiplication minimal, à savoir 16, soit atteint,
- le coefficient de variation moyen des taux de croissance spécifiques section par section (jours 0-1, 1-2 et 2-3, pour les essais de 72 heures) dans les cultures témoins (voir «coefficient de variation» au paragraphe 1.2) ne peut pas excéder 35 %. Voir le calcul du taux de croissance spécifique section par section au paragraphe 2.2.1, deuxième alinéa. Ce critère s'applique à la valeur moyenne des coefficients de variation calculés pour les expériences identiques du groupe témoin,
- le coefficient de variation des taux de croissance spécifiques moyens sur toute la durée de l'essai dans les cultures témoins identiques ne peut pas dépasser 7 % pour les essais menés sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus*. S'agissant des autres espèces moins souvent testées, cette valeur ne doit pas dépasser 10 %.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Appareillage**

Les récipients expérimentaux et les autres appareils entrant en contact avec les solutions d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il convient de les nettoyer à fond afin qu'aucun contaminant organique ou minéral n'interfère avec la croissance des algues ou la composition des solutions expérimentales.

Généralement en verre, les récipients d'essai possèdent des dimensions autorisant un volume de culture suffisant pour les mesures à effectuer durant l'essai et un transfert massique suffisant de CO_2 depuis l'atmosphère (voir paragraphe 1.8.9, deuxième alinéa). Notons que le volume de liquide doit être assez grand pour les déterminations analytiques (voir paragraphe 1.8.11, cinquième alinéa).

Une partie ou la totalité du matériel suivant est également nécessaire:

- appareillage destiné aux cultures: il est recommandé d'utiliser une armoire ou une enceinte dans laquelle la température d'incubation choisie peut être maintenue à ± 2 °C près,
- instruments de mesure de la lumière: il est important de savoir que la méthode de mesure de l'intensité lumineuse, et en particulier le type de capteur (collecteur), aura une influence sur la valeur mesurée. Il est préférable d'effectuer les mesures à l'aide d'un capteur sphérique 4π (sensible à la lumière directe et réfléchie provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) ou d'un capteur 2π (sensible à la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure),

▼ **M1**

— dispositif permettant de déterminer la biomasse des algues: la numération cellulaire, qui est le paramètre de substitution le plus fréquemment utilisé pour déterminer la biomasse des algues, peut être effectuée avec un compteur électronique de particules, un microscope équipé d'une enceinte de comptage ou un cytomètre à flux. D'autres paramètres de substitution de la biomasse peuvent être mesurés au moyen d'un cytomètre à flux, d'un fluorimètre, d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Il est utile de calculer le facteur de conversion du nombre de cellules en poids sec de biomasse. Afin d'obtenir des mesures utiles pour les faibles concentrations de biomasse quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'employer des cuves d'une longueur d'au moins 4 cm.

1.8.2. Organismes d'essai

Plusieurs espèces d'algues microscopiques et de cyanobactéries ne formant pas d'agrégats peuvent être utilisées. Il a été démontré que les souches énumérées à l'appendice 1 conviennent au protocole expérimental de cette méthode d'essai.

Si l'on utilise d'autres espèces, il faut mentionner leur souche et/ou leur origine. Il y a lieu de confirmer que la croissance exponentielle des algues d'essai sélectionnées peut être maintenue tout au long de l'essai dans les conditions appliquées.

1.8.3. Milieu de croissance

Deux milieux de croissance possibles sont préconisés: celui de l'OCDE et le milieu AAP. Les compositions de ces milieux sont détaillées à l'appendice 2. Il faut noter que la valeur initiale du pH et le pouvoir tampon (régulation de l'augmentation du pH) de ces deux milieux sont différents. En conséquence, les résultats des essais risquent d'être différents suivant le milieu employé, notamment avec des substances d'essai ionisantes.

Il peut parfois s'avérer nécessaire de modifier le milieu de croissance, par exemple si la substance d'essai est un métal ou un agent chélatant ou si l'essai est mené à différents pH. L'utilisation d'un milieu modifié doit être décrite en détail et justifiée (3)(4).

1.8.4. Concentration initiale de la biomasse

La biomasse initiale doit être identique dans toutes les cultures de l'essai et suffisamment basse pour autoriser une croissance exponentielle tout au long de la période d'incubation sans risque d'épuisement des éléments nutritifs. La biomasse initiale ne dépassera pas 0,5 mg/l en poids sec. On recommande les concentrations cellulaires initiales suivantes:

| | | |
|--|--------------------------|-------------|
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 5×10^3 - 10^4 | cellules/ml |
| <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 2 - 5×10^3 | cellules/ml |
| <i>Navicula pelliculosa</i> | 10^4 | cellules/ml |
| <i>Anabaena flos-aquae</i> | 10^4 | cellules/ml |
| <i>Synechococcus leopoliensis</i> | 5×10^4 - 10^5 | cellules/ml |

1.8.5. Concentrations de la substance d'essai

La gamme de concentrations dans laquelle des effets sont susceptibles de se produire peut être déterminée d'après les résultats d'essais de détermination de l'ordre de grandeur. L'essai proprement dit comprend au moins cinq concentrations formant une série géométrique et séparées par un facteur n'excédant pas 3,2. Un facteur supérieur peut se justifier pour les substances d'essai dont la courbe concentration-effet a une pente nulle. Il est préférable que la gamme de concentrations couvre des valeurs entraînant une inhibition de 5 à 75 % du taux de croissance des algues.

▼ M1**1.8.6. Expériences identiques et témoins**

L'essai comprend trois expériences identiques à chaque concentration expérimentale. S'il n'est pas nécessaire de déterminer la CSEO, l'essai peut être modifié de manière à inclure un plus grand nombre de concentrations et un plus petit nombre d'expériences identiques par concentration. Le nombre d'expériences identiques pour le témoin doit être au moins trois et, idéalement, le double du nombre d'expériences identiques utilisées à chaque concentration expérimentale.

Un ensemble séparé de solutions d'essai peut être préparé pour les déterminations analytiques des concentrations de la substance d'essai (voir paragraphe 1.8.11, quatrième et sixième alinéas).

Si la substance d'essai est solubilisée à l'aide d'un solvant, on inclura des témoins supplémentaires contenant le solvant à la même concentration que celle appliquée dans les cultures expérimentales.

1.8.7. Préparation de la culture de l'inoculum

Afin que les algues soumises à l'essai soient adaptées aux conditions expérimentales et soient bien en phase de croissance exponentielle lorsqu'on les utilise pour ensemercer les solutions d'essai, on prépare une culture d'inoculum dans le milieu expérimental, deux à quatre jours avant le début de l'essai. La biomasse des algues doit être ajustée afin que la culture de l'inoculum présente une croissance exponentielle jusqu'au moment où l'essai débute. La culture de l'inoculum est incubée dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. On mesure l'accroissement de la biomasse dans la culture de l'inoculum pour vérifier qu'elle présente une croissance normale pour la souche expérimentale en question dans les conditions de culture. Un exemple de méthode de culture des algues est décrit à l'appendice 3. Pour éviter des divisions cellulaires synchrones durant l'essai, il est parfois nécessaire de lancer une seconde étape de propagation de la culture de l'inoculum.

1.8.8. Préparation des solutions expérimentales

Toutes les solutions expérimentales doivent contenir les mêmes concentrations de milieu de croissance et la même biomasse initiale d'algues d'essai. On prépare généralement les solutions expérimentales aux concentrations choisies en mélangeant une solution mère de la substance d'essai avec le milieu de croissance et la culture de l'inoculum. Les solutions mères sont normalement préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

Des solvants, par exemple de l'acétone, de l'alcool t-butylique et du diméthylformamide, peuvent être utilisés comme véhicules pour ajouter des substances peu solubles dans l'eau au milieu expérimental (2)(3). La concentration de solvant ne doit pas excéder 100 µl/l et doit être identique dans toutes les cultures (y compris les témoins) de l'essai.

1.8.9. Incubation

Les récipients expérimentaux sont munis de bouchons perméables à l'air. Les récipients sont agités et placés dans l'appareil destiné aux cultures. Durant l'essai, il est nécessaire de garder les algues en suspension et de faciliter le transfert de CO₂. À cette fin, les récipients sont agités ou leur contenu remué en permanence. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 24 °C, maintenue à ± 2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être appliquées pour des espèces autres que celles reprises à l'appendice 1, par exemple des espèces tropicales, à condition que les critères de validité soient respectés. Il est recommandé de disposer les récipients de façon aléatoire et de modifier quotidiennement leur emplacement dans l'incubateur.

▼ **M1**

Le pH du milieu témoin ne doit pas augmenter de plus de 1,5 unité durant l'essai. Dans le cas des métaux et des substances qui s'ionisent partiellement à un pH proche de celui de l'essai, il peut s'avérer nécessaire de limiter l'évolution du pH, afin d'obtenir des résultats reproductibles et bien définis. Il est techniquement possible de limiter l'évolution du pH à $< 0,5$ unité en induisant un taux adéquat de transfert massique de CO_2 de l'air environnant à la solution d'essai, par exemple en augmentant l'intensité de l'agitation. Une autre possibilité consiste à diminuer la demande en CO_2 en réduisant la biomasse initiale ou la durée de l'essai.

La surface sur laquelle les cultures sont incubées reçoit un éclairage continu, uniforme et fluorescent, par exemple de type «lumière blanche froide» ou «lumière naturelle». Les besoins lumineux varient selon les souches d'algues et de cyanobactéries. L'intensité lumineuse doit être choisie en fonction de l'organisme d'essai utilisé. Pour les espèces d'algues vertes recommandées, l'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai doit être choisie dans l'intervalle $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) avec un capteur approprié. Certaines espèces, en particulier *Anabaena flos-aquae*, se développent bien sous des intensités lumineuses plus faibles et peuvent être endommagées par des intensités plus fortes. Pour ces espèces, il convient d'appliquer une intensité lumineuse moyenne comprise dans la gamme $40\text{--}60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (en ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 4 440-8 880 lux pour la lumière blanche froide correspond approximativement à l'intensité lumineuse recommandée de $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). L'intensité lumineuse ne s'écartera pas de plus de $\pm 15 \%$ de l'intensité lumineuse moyenne dans la zone de l'incubation.

1.8.10. **Durée de l'essai**

L'essai dure normalement soixante-douze heures. Néanmoins, des durées plus ou moins longues peuvent être appliquées, à condition que tous les critères de validité mentionnés au paragraphe 1.7 soient respectés.

1.8.11. **Mesures et déterminations analytiques**

La biomasse des algues contenue dans chaque flacon est déterminée au moins une fois par jour durant la période d'essai. Si les mesures sont effectuées sur de petits volumes extraits de la solution d'essai avec une pipette, ceux-ci ne doivent pas être réintroduits dans le récipient d'essai.

La biomasse est mesurée par comptage manuel des cellules au microscope ou au moyen d'un compteur électronique de particules (dénombrement des cellules et/ou biovolume). D'autres techniques, par exemple la cytométrie à flux, la fluorescence chlorophyllienne in vitro ou in vivo (6)(7) ou la densité optique, peuvent être utilisées, à condition de pouvoir démontrer qu'il existe une corrélation satisfaisante avec la biomasse dans la gamme de valeurs de la biomasse de l'essai.

Le pH des solutions est mesuré au début et à la fin de l'essai.

Si l'on dispose d'une méthode permettant d'analyser la substance d'essai dans la gamme de concentrations appliquées, il faut analyser les solutions expérimentales afin de vérifier les concentrations initiales et le maintien des concentrations d'exposition durant l'essai.

▼ M1

L'analyse de la concentration de la substance d'essai, au début et à la fin de l'essai, dans des récipients renfermant une concentration élevée, une concentration faible et une concentration proche de la CE₅₀ escomptée peut suffire si les concentrations d'exposition ne sont pas censées s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales durant l'essai. Il est préconisé d'analyser toutes les concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai si les concentrations ne sont pas supposées demeurer dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration nominale. S'agissant des substances d'essai volatiles, instables ou s'adsorbant fortement, on recommande de prélever des échantillons à analyser toutes les vingt-quatre heures durant la période d'exposition, afin de préciser la perte de substance d'essai. Pour ces substances, le nombre d'expériences identiques devra être augmenté. Dans tous les cas, il suffira de déterminer la concentration de la substance d'essai dans un seul récipient traité de manière identique pour chaque concentration expérimentale (ou dans le mélange du contenu de tous les récipients traités de manière identique).

Les milieux d'essai destinés spécialement à l'analyse des concentrations d'exposition durant l'essai doivent être traités de la même manière que les milieux utilisés pour l'essai: ils doivent être ensemencés avec les algues et incubés dans des conditions identiques. Si l'on doit analyser la concentration de la substance d'essai dissoute, les algues devront peut-être être séparées du milieu. À cette fin, il est préférable de procéder par centrifugation à une faible force d'accélération, suffisante pour sédimenter les algues.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant la baisse de la concentration de la substance d'essai (3)(8).

L'essai d'inhibition de la croissance des algues est un système expérimental plus dynamique que la plupart des autres essais de toxicité à court terme sur des organismes aquatiques. En conséquence, les concentrations d'exposition réelles risquent d'être difficiles à définir, en particulier pour les substances s'adsorbant testées à faibles concentrations. Dans ces circonstances, la disparition de la substance de la solution par adsorption sur la biomasse croissante des algues ne signifie pas que la substance d'essai a disparu du système d'essai. En analysant le résultat de l'essai, il y a lieu de vérifier si la diminution de la concentration de la substance d'essai au cours de l'essai s'est accompagnée d'une baisse de l'inhibition de la croissance. Si tel est le cas, on peut envisager d'appliquer un modèle décrivant convenablement la baisse de la concentration de la substance d'essai (8). Dans le cas contraire, il sera peut-être pertinent de fonder l'analyse des résultats sur les concentrations initiales (nominales ou mesurées).

1.8.12. Autres observations

On observe au microscope la culture de l'inoculum pour vérifier si elle présente un aspect normal et sain ainsi que l'aspect des algues pour détecter la présence éventuelle d'anomalies (susceptibles de résulter de l'exposition à la substance d'essai) à la fin de l'essai.

▼ **M1****1.8.13. Essai limite**

Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut réaliser un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être au moins égal à six. Les variables étudiées dans le groupe témoin et le groupe traité peuvent être analysées au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student. Si les variances des deux groupes sont inégales, on effectue un test t ajusté en fonction des variances inégales.

1.8.14. Modification pour les substances fortement colorées

L'irradiation (intensité lumineuse) doit être réalisée dans le haut de l'intervalle imposé dans cette méthode d'essai: $120\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ou une valeur plus élevée.

Le trajet des rayons lumineux doit être raccourci en réduisant le volume des solutions expérimentales (de l'ordre de 5-25 ml).

Un mouvement suffisant (par exemple, par une agitation modérée) doit être assuré pour obtenir une fréquence d'exposition élevée des algues à une forte irradiation à la surface de la culture.

2. RÉSULTATS**2.1. TRACÉ DES COURBES DE CROISSANCE**

La biomasse des récipients d'essai peut être exprimée en unités du paramètre de substitution utilisé pour la mesurer (nombre de cellules, fluorescence, par exemple).

Porter dans un tableau la concentration estimée de la biomasse dans les cultures expérimentales et les cultures témoins, les concentrations de la substance d'essai et les temps de mesure enregistrés avec une précision minimale de l'ordre de l'heure, afin d'obtenir les points des courbes de croissance. Les échelles tant logarithmiques que linéaires peuvent être utiles à ce premier stade, mais les échelles logarithmiques sont indispensables et représentent généralement mieux les variations du rythme de la croissance durant l'essai. Notons que la croissance exponentielle produit une droite lorsqu'elle est portée sur une échelle logarithmique et que la pente de cette droite indique le taux de croissance spécifique.

À l'aide des points portés sur le graphique, examiner si les cultures témoins se développent au rythme exponentiel prévu tout au long de l'essai. Étudier attentivement tous les points et l'allure des graphiques et vérifier si les données brutes et les méthodes employées ne sont entachées d'aucune erreur. Vérifier en particulier tous les points qui semblent s'écarter du tracé suivant une erreur systématique. Si, à l'évidence, la manière dont on a procédé comporte des erreurs identifiables ou très probables, le point concerné est à signaler comme une valeur aberrante et ne doit pas être pris en compte dans l'analyse statistique ultérieure (une concentration nulle d'algues dans un des récipients traités de manière identique sur deux ou trois peut révéler que le récipient n'a pas étéensemencé correctement ou qu'il n'a pas été suffisamment bien nettoyé). Les raisons pour lesquelles on a décidé d'exclure un point parce qu'on le considère comme une valeur aberrante doivent être exposées clairement dans le rapport d'essai. Les raisons acceptées ne représentent que des erreurs méthodologiques (rares) et non un manque de précision. Les méthodes statistiques d'identification des valeurs aberrantes sont d'un usage limité pour ce type de problème et ne peuvent remplacer le jugement d'un expert. Il est préférable de conserver les valeurs aberrantes (signalées comme telles) parmi les données présentées ultérieurement sur un graphique ou un tableau.

▼ **M1**

2.2. VARIABLES ÉTUDIÉES

Cet essai a pour but de déterminer les effets de la substance d'essai sur la croissance des algues. Cette méthode d'essai décrit deux variables étudiées, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires des pays membres. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables dans tous les pays membres, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.

- a) Taux de croissance spécifique moyen: cette variable étudiée est calculée d'après l'accroissement logarithmique de la biomasse pendant la durée de l'essai, exprimé par jour.
- b) Rendement: cette variable étudiée correspond à la valeur de la biomasse à la fin de l'essai diminuée de la valeur de la biomasse au début de l'essai.

Pour l'application de cette méthode dans le cadre réglementaire de l'UE, le calcul des résultats doit être fondé sur un taux de croissance spécifique moyen, pour les raisons décrites ci-dessous. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x fondées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_T) seront généralement supérieures à celles fondées sur le rendement (C_xE_r) si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont respectées, en raison de la base mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur le type général de croissance exponentielle des algues dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats fondés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce d'algue utilisée dans chaque essai et du taux de croissance spécifique maximal, susceptible de varier d'une espèce d'algue à une autre, voire d'une souche à une autre. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité des espèces d'algues, voire de différentes souches d'algue, à des substances toxiques. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode propose également des estimations fondées sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays.

2.2.1. Taux de croissance spécifique moyen

Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé comme l'accroissement logarithmique de la biomasse, pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins, au moyen de l'équation présentée ci-dessous:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (jour}^{-1}\text{)}$$

où:

μ_{i-j} est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

X_i est la biomasse au temps i ;

X_j est la biomasse au temps j .

▼ **M1**

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

Calculer le taux de croissance spécifique moyen sur toute la durée de l'essai (normalement du jour 0 au jour 3), en prenant, comme valeur de départ, la valeur nominale de la biomasseensemencée plutôt que sa valeur mesurée, car cela permet généralement d'obtenir une plus grande précision. Si l'instrument utilisé pour mesurer la biomasse autorise des déterminations suffisamment précises d'une petite biomasse d'inoculum (par exemple, un cytomètre à flux), la concentration initiale mesurée de la biomasse peut alors être utilisée. Évaluer également les taux de croissance section par section en considérant, pour ce calcul, qu'ils équivalent aux taux de croissance spécifiques de chaque jour de l'essai (jours 0-1, 1-2 et 2-3) et vérifier si le taux de croissance des témoins reste constant (voir critères de validité, paragraphe 1.7). Le fait que le taux de croissance spécifique du premier jour soit sensiblement inférieur au taux de croissance spécifique moyen peut indiquer une phase de latence. S'il est possible de réduire presque à néant la phase de latence dans les cultures témoins par une propagation appropriée de la préculture, la présence d'une phase de latence dans les cultures exposées peut refléter un rétablissement après un choc toxique initial ou une exposition réduite due à une perte de substance d'essai (notamment par sorption sur la biomasse des algues) après l'exposition initiale. Le taux de croissance section par section permet ainsi d'étudier les différents effets de la substance d'essai durant la période d'exposition, d'où son intérêt. Des différences sensibles entre le taux de croissance section par section et le taux de croissance moyen traduisent un écart par rapport à la croissance exponentielle constante et appellent un examen attentif des courbes de croissance.

Calculer le pourcentage d'inhibition du taux de croissance pour chaque expérience identique de chaque groupe traité à l'aide de l'équation suivante:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

où:

$\%I_r$ est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen;

μ_C est la valeur moyenne du taux de croissance spécifique moyen (μ) dans le groupe témoin;

μ_T est le taux de croissance spécifique moyen d'une des expériences identiques du groupe traité.

Si les solutions d'essai sont préparées à l'aide d'un solvant, c'est le témoin au solvant plutôt que le témoin sans solvant qui doit être utilisé pour calculer le pourcentage d'inhibition.

2.2.2. Rendement

Le rendement est calculé d'après la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de l'essai et sa valeur au début de l'essai pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins. Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque expérience identique de chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_r = \frac{(R_C - R_T)}{R_C} \times 100$$

▼ M1

où:

$\%I_i$ est le pourcentage d'inhibition du rendement;

R_C est la valeur moyenne du rendement dans le groupe témoin;

R_T est la valeur du rendement dans l'une des expériences identiques du groupe traité.

2.3. TRACÉ DES COURBES CONCENTRATION-EFFET

Porter sur un graphique le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai et examiner les points obtenus attentivement, sans tenir compte des points ayant été éliminés parce que considérés comme des valeurs aberrantes au cours de la première phase. Faire passer une courbe régulière entre les points, à vue d'œil ou par interpolation informatique, afin d'obtenir une première impression de la relation concentration-effet et poursuivre par une méthode plus détaillée, de préférence une méthode statistique informatisée. En fonction de l'usage auquel on destine les données, de la qualité (précision) et de la quantité des données ainsi que de la disponibilité des outils d'analyse des données, on pourra décider (et cela se justifiera parfaitement dans certains cas) d'arrêter l'analyse des données à ce stade et de ne retenir que les chiffres clés, à savoir la CE_{50} et la CE_{10} (et/ou la CE_{20}), de la courbe ajustée à vue d'œil (voir également le paragraphe ci-après sur les effets stimulants). Citons quelques raisons valables de ne pas recourir à une méthode statistique:

- traitées par des méthodes informatisées, les données ne livreront pas de résultats plus fiables que ceux obtenus par une analyse d'expert — dans ces circonstances, certains programmes informatiques risquent même d'être incapables de produire une solution fiable (les itérations peuvent ne pas converger, etc.),
- les effets stimulant la croissance ne peuvent être traités correctement par les programmes informatiques disponibles (voir plus bas).

2.4. MÉTHODES STATISTIQUES

L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'appliquer une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé — par exemple, en unités probit ou logit ou Weibull (9), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (9). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull se prêtent aux effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs de croissance ou de biomasse. Les références (10)(11) et (12) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues. L'utilisation d'une analyse de la régression non linéaire est détaillée à l'appendice 4.

▼ M1

Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités. Si toutefois, l'ajustement d'une courbe non linéaire est difficile ou échoue parce que les données sont trop dispersées, une régression peut alors être effectuée sur les moyennes des groupes, ce qui permet de réduire l'influence des valeurs que l'on soupçonne aberrantes. Le recours à cette option doit être signalé dans le rapport d'essai en tant qu'écart par rapport à la procédure normale, dû au fait que l'ajustement de la courbe avec les valeurs individuelles des expériences identiques n'a pas livré un bon résultat.

Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec *bootstrap* (rééchantillonnage) (13) si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, pour les effets de la substance d'essai sur le taux de croissance, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par des techniques d'analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (14)(15)(16)(17)(18). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance se confirme. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (18), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (12) fournit des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

Des découvertes récentes ont conduit les scientifiques à préconiser l'abandon de la notion de CSEO au profit d'estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur de x appropriée n'a encore été établie pour cet essai sur les algues. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

2.5. STIMULATION DE LA CROISSANCE

On observe quelquefois une stimulation de la croissance (inhibition négative) aux faibles concentrations. Ce phénomène peut résulter d'une hormone («stimulation toxique») ou de l'introduction de facteurs de stimulation de la croissance, véhiculés par la substance d'essai, dans le milieu minimal utilisé. Notons que l'ajout de nutriments minéraux ne devrait exercer aucun effet direct, étant donné que le milieu d'essai doit contenir un excès de nutriments tout au long de l'essai. La stimulation à faible dose peut habituellement être ignorée dans les calculs de la CE_{50} , à moins qu'elle ne soit très prononcée. Néanmoins, si cette stimulation est extrême ou s'il faut calculer une valeur de CE_x pour une faible valeur de x , des procédures particulières pourraient être requises. On évitera, dans la mesure du possible, de soustraire les effets stimulants à l'analyse des données et, si le logiciel permettant d'ajuster la courbe ne peut pas accepter une stimulation mineure, une interpolation linéaire avec *bootstrap* peut être employée. Si la stimulation est extrême, l'utilisation d'un modèle d'hormèse est envisageable (19).

▼ M1

2.6. INHIBITION NON TOXIQUE DE LA CROISSANCE

Les substances d'essai absorbant la lumière peuvent abaisser le taux de croissance, car l'obscurcissement diminue la quantité de lumière disponible. Il y a lieu de séparer ces types d'effets physiques des effets toxiques en modifiant les conditions expérimentales et de rapporter les premiers séparément. Les références (2) et (3) donnent des indications à ce sujet.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes, y compris la limite de solubilité dans l'eau,
- données d'identification chimique, notamment pureté.

Espèce soumise à l'essai:

- souche, fournisseur ou source et conditions de culture utilisées.

Conditions expérimentales:

- date du début de l'essai et durée de l'essai,
- description de la conception de l'essai: récipients d'essai, volumes des cultures, densité de la biomasse au début de l'essai,
- composition du milieu,
- concentrations expérimentales et expériences identiques (par exemple, nombre d'expériences identiques, nombre de concentrations expérimentales et progression géométrique appliquée),
- description de la préparation des solutions expérimentales, y compris l'utilisation de solvants, etc.,
- appareillage destiné aux cultures,
- intensité et qualité lumineuses (source, homogénéité),
- température,
- concentrations mises à l'essai: concentrations d'essai nominales et tous les résultats des analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux. Le rendement de récupération de la méthode et le seuil de quantification dans la matrice expérimentale doivent être mentionnés,
- tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai,
- méthode de détermination de la biomasse et démonstration de la corrélation entre le paramètre mesuré et le poids sec.

Résultats:

- valeurs du pH au début et à la fin de l'essai dans tous les récipients traités,
- biomasse dans chaque récipient à chaque point de mesure et méthode de mesure de la biomasse,

▼ M1

- courbes de croissance (biomasse en fonction du temps),
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique de chaque traitement ainsi que des moyennes et du coefficient de variation des expériences identiques,
- représentation graphique de la relation concentration-effet,
- estimation de la toxicité pour les variables étudiées, par exemple la CE₅₀, la CE₁₀ et la CE₂₀ et intervalles de confiance associés; CME0 et CSEO, si elles ont été calculées, et méthodes statistiques appliquées à leur détermination,
- si une analyse de la variance (ANOVA) a été pratiquée, puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative),
- stimulation de la croissance éventuellement observée dans un groupe traité,
- tout autre effet observé, par exemple changement morphologique des algues,
- analyse des résultats, notamment l'influence d'un éventuel écart par rapport à cette méthode d'essai sur les résultats de l'essai.

4. BIBLIOGRAPHIE

- 1) OCDE LD 201 (2006) Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance
- 2) ISO 1998: Qualité de l'eau — lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduaires. ISO/DIS 14442
- 3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.
- 4) ISO 1998: Qualité de l'eau — échantillonnage — partie 16: lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons. ISO 5667-16.
- 5) ISO 1993: Qualité de l'eau — essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires. ISO 8692.
- 6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- 7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5 (1977), pp.919-925
- 8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 2073-2079.
- 9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.

▼ M1

- 10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- 11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem.* 11:1485-1494.
- 12) OECD. (2004). *Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.*
- 13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- 14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- 15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- 16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- 17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- 18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼ **M1***Appendice 1***Souches convenant à l'essai****Algues vertes**

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (autrefois dénommée *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.
- *Desmodesmus subspicatus* (autrefois dénommée *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Diatomées

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobactéries

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources des souches

Les souches recommandées sont disponibles sous la forme de cultures unialgales dans les collections suivantes (par ordre alphabétique):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

ROYAUME-UNI

SAG: Collection of Algal Cultures

Albrecht-von-Haller-Institut

University of Göttingen

Nicholausberger Weg 18

D-37073 Göttingen

ALLEMAGNE

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

▼ **M1****Aspect et caractéristiques des espèces recommandées**

| | <i>P. subcapitata</i> | <i>D. subspicatus</i> | <i>N. pelliculosa</i> | <i>A. flos-aquae</i> | <i>S. leopoliensis</i> |
|---|---|---|------------------------|----------------------------|------------------------|
| Aspect | Cellules solitaires, incurvées et torsées | Cellules ovales et solitaires la plupart du temps | Bâtonnets | Chaînes de cellules ovales | Bâtonnets |
| Dimensions (L × l) µm | 8-14 × 2-3 | 7-15 × 3-12 | 7,1 × 3,7 | 4,5 × 3 | 6 × 1 |
| Volume cellulaire (µm ³ /cellule) | 40-60 ⁽¹⁾ | 60-80 ⁽¹⁾ | 40-50 ⁽¹⁾ | 30-40 ⁽¹⁾ | 2,5 ⁽²⁾ |
| Poids sec des cellules (mg/cellule) | 2-3 × 10 ⁻⁸ | 3-4 × 10 ⁻⁸ | 3-4 × 10 ⁻⁸ | 1-2 × 10 ⁻⁸ | 2-3 × 10 ⁻⁹ |
| Taux de croissance ⁽³⁾ (jour ⁻¹) | 1,5-1,7 | 1,2-1,5 | 1,4 | 1,1-1,4 | 2,0-2,4 |

⁽¹⁾ Mesuré avec un compteur électronique de particules.

⁽²⁾ Calculé d'après la taille.

⁽³⁾ Taux de croissance le plus souvent observé dans le milieu de l'OCDE sous une intensité lumineuse approximative de 70 µE·m⁻²·s⁻¹ et à 21 °C.

Recommandations particulières pour la culture et la manipulation des espèces d'essai recommandées*Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus*

Ces algues vertes sont généralement faciles à cultiver dans différents milieux de culture. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Les cellules sont normalement solitaires, et la densité cellulaire se mesure aisément à l'aide d'un compteur électronique de particules ou d'un microscope.

Anabaena flos-aquae

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Il importe particulièrement d'éviter que la culture des lots ait dépassé la phase exponentielle de croissance au moment du renouvellement, le rétablissement étant difficile à ce stade.

Anabaena flos-aquae forme des chaînes de cellules enroulées en pelotes (agrégats). La dimension de ces agrégats est susceptible de varier en fonction des conditions de culture. Il peut s'avérer nécessaire de dissocier ces agrégats pour compter les cellules au microscope ou avec un compteur électronique de particules, afin de déterminer la biomasse.

Les chaînes de sous-échantillons peuvent être rompues en différents points par sonication, afin de réduire la variabilité lors du comptage. Une sonication plus longue que celle requise pour couper les chaînes en petits segments risque de détruire les cellules. L'intensité et la durée de la sonication doivent être identiques pour chaque traitement.

On dénombrera suffisamment de champs sur l'hémocytomètre (au moins quatre cents cellules) afin de compenser la variabilité. Cela augmentera la fiabilité des déterminations de la densité au microscope.

Après le découpage des chaînes de cellules par une sonication menée délicatement, le volume cellulaire total d'*Anabaena* peut être déterminé avec un compteur électronique de particules. Il convient de régler l'énergie de la sonication de façon à éviter de briser les cellules.

Utiliser un mélangeur à vortex ou un instrument analogue pour s'assurer que la suspension d'algues utilisée pour ensemercer les récipients d'essai est bien mélangée et homogène.

▼ M1

Les récipients d'essai doivent être placés sur une table d'agitation animée d'un mouvement orbital ou de va-et-vient à environ cent cinquante tours par minute. Les *Anabaena* peuvent également être agitées par intermittence de façon à former moins d'agrégats. Si elles s'agrègent, on veillera à prélever des échantillons représentatifs pour les mesures de biomasse. Une agitation vigoureuse avant le prélèvement peut être nécessaire pour désagréger les agrégats d'algues.

Synechococcus leopoliensis

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés.

Synechococcus leopoliensis croît en formant des bâtonnets solitaires. La très petite dimension des cellules rend difficile le comptage au microscope pour les mesures de biomasse. Dans ce cas, il est utile de disposer d'un compteur électronique capable de dénombrer des particules mesurant jusqu'à 1 µm. Une mesure par fluorométrie in vitro convient également.

Navicula pelliculosa

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ici, le milieu doit être additionné de silicate.

Navicula pelliculosa peut former des agrégats dans certaines conditions de culture. À cause de leur production lipidique, les cellules algales tendent parfois à s'accumuler dans le film qui se forme à la surface. Si tel est le cas, des mesures spéciales accompagneront le prélèvement de sous-échantillons en vue de la détermination de la biomasse, afin d'assurer la représentativité des échantillons. Une agitation vigoureuse, par exemple au moyen d'un mélangeur à vortex, peut être nécessaire.

▼ **M1***Appendice 2***Milieux de croissance**

L'un des deux milieux de croissance suivants peut être utilisé:

Milieu de l'OCDE: milieu de la première version de la ligne directrice 201 de l'OCDE, conforme à la norme ISO 8692

Milieu AAP de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), conforme à l'ASTM.

Ces milieux doivent être préparés avec des produits de qualité «réactifs» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

Composition du milieu AAP (US EPA) et du milieu de la ligne directrice 201 de l'OCDE

| Ingrédient | US EPA | | OCDE | |
|---|----------|------------|---------|--------------|
| | mg/l | mM | mg/l | mM |
| NaHCO ₃ | 15,0 | 0,179 | 50,0 | 0,595 |
| NaNO ₃ | 25,5 | 0,300 | | |
| NH ₄ Cl | | | 15,0 | 0,280 |
| MgCl ₂ ·6(H ₂ O) | 12,16 | 0,0598 | 12,0 | 0,0590 |
| CaCl ₂ ·2(H ₂ O) | 4,41 | 0,0300 | 18,0 | 0,122 |
| MgSO ₄ ·7(H ₂ O) | 14,6 | 0,0592 | 15,0 | 0,0609 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,044 | 0,00599 | | |
| KH ₂ PO ₄ | | | 1,60 | 0,00919 |
| FeCl ₃ ·6(H ₂ O) | 0,160 | 0,000591 | 0,0640 | 0,000237 |
| Na ₂ EDTA·2(H ₂ O) | 0,300 | 0,000806 | 0,100 | 0,000269 (*) |
| H ₃ BO ₃ | 0,186 | 0,00300 | 0,185 | 0,00299 |
| MnCl ₂ ·4(H ₂ O) | 0,415 | 0,00201 | 0,415 | 0,00210 |
| ZnCl ₂ | 0,00327 | 0,000024 | 0,00300 | 0,0000220 |
| CoCl ₂ ·6(H ₂ O) | 0,00143 | 0,000006 | 0,00150 | 0,00000630 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O) | 0,00726 | 0,000030 | 0,00700 | 0,0000289 |
| CuCl ₂ ·2(H ₂ O) | 0,000012 | 0,00000007 | 0,00001 | 0,00000006 |
| pH | 7,5 | | 8,1 | |

(*) Le rapport molaire de l'EDTA sur le fer est légèrement supérieur à l'unité. Cela empêche le fer de précipiter et réduit en même temps au minimum la chélation des ions de métaux lourds.

Dans l'essai mené sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, les deux milieux doivent être additionnés de Na₂SiO₃·9H₂O, afin d'atteindre une concentration de 1,4 mg de Si/l.

Le pH du milieu est obtenu à l'équilibre entre le système carbonate du milieu et la pression partielle de CO₂ dans l'air atmosphérique. Le pH à 25 °C et la concentration molaire de bicarbonate sont liés de façon approximative par l'équation suivante:

$$\text{pH}_{\text{éq}} = 11,30 + \log [\text{HCO}_3^-]$$

▼ **M1**

Avec 15 mg/l de NaHCO_3 , le $\text{pH}_{\text{éq}} = 7,5$ (milieu de l'US EPA) et avec 50 mg/l de NaHCO_3 , le $\text{pH}_{\text{éq}} = 8,1$ (milieu de l'OCDE).

Composition élémentaire du milieu d'essai

| Élément | US EPA | OCDE |
|---------|--------|--------|
| | mg/l | mg/l |
| C | 2,144 | 7,148 |
| N | 4,202 | 3,927 |
| P | 0,186 | 0,285 |
| K | 0,469 | 0,459 |
| Na | 11,044 | 13,704 |
| Ca | 1,202 | 4,905 |
| Mg | 2,909 | 2,913 |
| Fe | 0,033 | 0,017 |
| Mn | 0,115 | 0,115 |

Préparation du milieu de l'OCDE

| Élément nutritif | Concentration dans la solution mère |
|--|-------------------------------------|
| Solution mère 1: macroéléments | |
| NH_4Cl | 1,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1,8 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| KH_2PO_4 | 0,16 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| Solution mère 2: fer | |
| $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 64 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| Solution mère 3: oligoéléments | |
| H_3BO_3 | 185 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 415 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| ZnCl_2 | 3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,01 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 7 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| Solution mère 4: bicarbonate | |
| NaHCO_3 | 50 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | |

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores: 0,2 μm) ou à l'autoclave (15 minutes à 120 °C). Stocker les solutions à l'obscurité et à 4 °C.

Ne pas autoclaver les solutions mères 2 et 4 mais les stériliser par filtration sur membrane.

▼ M1

Préparer le milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères 1 à 4 à de l'eau:

Ajouter à 500 ml d'eau stérilisée:

- 10 ml de solution mère 1,
- 1 ml de solution mère 2,
- 1 ml de solution mère 3,
- 1 ml de solution mère 4.

Porter à 1 000 ml avec de l'eau stérilisée.

Attendre que le milieu atteigne l'équilibre avec le CO₂ atmosphérique, si nécessaire en y faisant barboter de l'air stérile et filtré durant quelques heures.

Préparation du milieu AAP

A1.1. Ajouter 1 ml de chaque solution mère visée aux points A1.2.1 à A1.2.7 ci-après à environ 900 ml d'eau désionisée ou distillée, et porter le volume à 1 litre.

A1.2. Préparer les solutions mères de macroéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée. Les réactifs A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 et A1.2.4 peuvent être combinés dans une seule solution mère.

A1.2.1. $NaNO_3$ – 12,750 g.

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g.

A1.2.4. *Solution mère d'oligoéléments* (voir A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 – 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ – 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — Voir note A1.1.

NOTE A1.1. — À n'utiliser que pour les diatomées. Peut être ajouté directement (202,4 mg) ou véhiculé dans une solution mère pour donner une concentration finale de 20 mg/l en Si dans le milieu.

A1.3. Préparer la solution mère d'oligoéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée:

A1.3.1. H_3BO_3 —92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$ —1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ —79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ —0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ —3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ —0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ — 150,000 mg.

[Éthylènedinitrilotétraacétate de sodium].

▼ M1

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ —0,005 mg; voir note A1.2.

NOTE A1.2. — À n'utiliser que dans le milieu pour les substances mères des diatomées.

A1.4. Ajuster le pH à $7,5 \pm 0,1$ avec du NaOH ou de l'HCl 0,1 *N* ou 1,0 *N*.

A1.5. Filtrer le milieu dans un récipient stérile sur un filtre à membrane à pores de 0,22 μm si l'on utilise un compteur de particules, ou sur un filtre à pores de 0,45 μm si l'on n'utilise pas de compteur de particules.

A1.6. Garder le milieu à l'obscurité, à environ 4 °C jusqu'à son utilisation.

▼ M1*Appendice 3***Exemple de méthode de culture des algues****Observations générales**

La méthode suivante s'applique à la culture des algues destinées aux essais de toxicité.

Il convient d'utiliser des méthodes préservant les cultures d'algues de toute contamination bactérienne. Il peut être souhaitable d'établir des cultures axéniques, mais il faut employer des cultures unialgales.

Toutes les opérations doivent être réalisées dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination par des bactéries ou d'autres algues.

Matériel

Voir à la section «Appareillage» de la méthode d'essai.

Procédé d'obtention de cultures d'algues*Préparation de solutions nutritives (milieu):*

Tous les sels minéraux du milieu sont préparés sous la forme de solutions mères concentrées et entreposées au frais et à l'abri de la lumière. Ces solutions sont stérilisées par filtration ou à l'autoclave.

On prépare le milieu en ajoutant une quantité correcte de solution mère à de l'eau distillée stérile, en prenant bien soin d'éviter tout risque d'infection. Pour les milieux solides, on ajoute 0,8 % d'agar.

Culture mère:

Les cultures mères qui servent de matériau d'essai initial sont de petites cultures d'algues régulièrement transférées dans un milieu frais. Si les cultures ne sont pas utilisées régulièrement, il convient de les étaler en stries dans des tubes inclinés remplis d'agar. Ces cultures sont transférées dans un milieu frais au moins une fois tous les deux mois.

Les cultures mères sont cultivées dans des erlenmeyers contenant le milieu approprié (volume de quelque 100 ml). Lorsque les algues sont incubées à 20 °C sous un éclairage permanent, un transfert hebdomadaire s'impose.

Lors du transfert, on transvase avec des pipettes stériles une quantité de «vieille» culture dans un flacon de milieu frais de manière que, pour les espèces à croissance rapide, la concentration initiale soit environ cent fois inférieure à ce qu'elle était dans la vieille culture.

Le taux de croissance d'une espèce peut être déterminé à partir de la courbe de croissance. S'il est connu, il est possible d'estimer la densité à laquelle la culture doit être introduite dans le nouveau milieu. Il convient de le faire avant que la culture n'atteigne la phase de mort.

Préculture:

La préculture sert à fournir une quantité d'algues suffisante pour l'ensemencement des cultures d'essai. La préculture est incubée dans les conditions de l'essai et utilisée lorsqu'elle est encore en croissance exponentielle, normalement après une période d'incubation de deux à quatre jours. Si les cultures d'algues renferment des cellules déformées ou anormales, il faut éliminer ces cultures.

▼ **M1***Appendice 4***Analyse des données par une régression non linéaire****Considérations générales**

L'effet observé dans les essais sur les algues et autres essais sur la croissance de micro-organismes (augmentation de la biomasse) est, par nature, exprimé par une variable continue ou métrique — le rythme d'un processus si l'on utilise le taux de croissance et son intégrale en fonction du temps si on choisit la biomasse. Ces deux variables sont comparées à l'effet moyen correspondant observé sur des témoins non exposés (représentés en plusieurs exemplaires identiques) manifestant un effet maximal dans les conditions imposées, la lumière et la température étant les principaux facteurs déterminants dans l'essai sur les algues. Le système est distribué ou homogène, et la biomasse peut être considérée comme un continuum, en faisant abstraction des cellules individuelles. La distribution de la variance du type d'effet d'un tel système ne dépend que des facteurs expérimentaux (décrits généralement par les distributions log-normales ou normales de l'erreur), et ce, contrairement aux bioessais classiques où les effets sont exprimés par des réponses par tout ou rien, pour lesquelles il est souvent admis que la tolérance (affichant généralement une distribution binomiale) de chaque organisme constitue la composante dominante de la variance. Dans ce cas, l'effet relevé chez les témoins est nul ou assimilé à un niveau de fond.

Dans la situation simple, l'effet normalisé ou relatif, r , décroît de 1 (inhibition nulle) à 0 (inhibition à 100 %). Notons que tous les effets ont une erreur associée et qu'il est possible de calculer les inhibitions négatives apparentes en considérant qu'elles résultent uniquement de l'erreur aléatoire.

Analyse de la régression*Modèles*

Une analyse de régression a pour objet de décrire quantitativement la courbe concentration-effet sous la forme d'une fonction mathématique de régression $Y = f(C)$ ou, plus souvent, $F(Z)$ où $Z = \log C$. La fonction inverse, $C = f^{-1}(Y)$ permet de calculer des valeurs de la CE_x , notamment les CE_{50} , CE_{10} et CE_{20} , et leurs limites de confiance à 95 %. Il se trouve que plusieurs fonctions mathématiques simples décrivent correctement la relation concentration-effet obtenue dans les essais d'inhibition de la croissance des algues. Parmi ces fonctions, citons l'équation logistique, l'équation asymétrique de Weibull et la distribution log-normale, qui sont toutes des courbes sigmoïdes se rapprochant asymptotiquement de un pour $C \rightarrow 0$ et de zéro pour $C \rightarrow \text{infini}$.

L'utilisation de modèles de fonctions de seuil continues (par exemple, le modèle de Kooijman pour «l'inhibition de la croissance de la population», Kooijman et al., 1996) constitue une solution récemment proposée, différente des modèles asymptotiques. Ce modèle suppose qu'il n'y ait pas d'effet aux concentrations inférieures à un certain seuil, CE_{0+} , estimé par une extrapolation de la relation concentration-effet consistant à intercepter l'axe des concentrations à l'aide d'une fonction continue simple non différentiable au point de départ.

Notons que l'analyse peut être une simple minimisation des sommes des carrés résiduels (en supposant que la variance soit constante) ou des carrés pondérés si l'hétérogénéité de la variance est compensée.

▼ **M1***Marche à suivre*

Sélectionner une équation fonctionnelle appropriée, $Y = f(C)$, et l'ajuster aux données par une régression non linéaire. Utiliser de préférence les mesures relevées dans chaque flacon, plutôt que les moyennes des expériences identiques, afin de tirer un maximum d'informations des données. D'un autre côté, si la variance est élevée, l'expérience pratique nous porte à croire que les moyennes des expériences identiques peuvent fournir une estimation mathématique plus solide, moins influencée par les erreurs aléatoires des données que chaque point pris individuellement.

Porter sur un graphique les valeurs mesurées et la courbe ajustée et vérifier si l'ajustement est valable. L'analyse des valeurs résiduelles peut être particulièrement utile à ce propos. Si la fonction choisie pour ajuster la courbe concentration-effet ne décrit pas bien l'ensemble de la courbe ou une partie essentielle de celle-ci, telle que les effets aux faibles concentrations, choisir un autre modèle d'ajustement, par exemple une courbe asymétrique, telle que la fonction de Weibull, à la place d'une fonction symétrique. Les inhibitions négatives peuvent poser un problème, par exemple avec la fonction de distribution log-normale, qui nécessitera, de la même manière, la recherche d'une autre fonction de régression. Il est déconseillé d'assigner une valeur nulle ou une faible valeur positive à ces valeurs négatives parce que cela fausse la distribution des erreurs. Il peut être utile de procéder à des ajustements séparés sur des portions de la courbe telles que celle où l'inhibition est faible, afin d'estimer les valeurs de CE_x faibles. En partant de l'équation ajustée [par «estimation inverse», $C = f^{-1}(Y)$], calculer des estimations ponctuelles caractéristiques des CE_x et rapporter au moins la CE_{50} et une ou deux CE_x faibles. La pratique des essais a montré que la précision de l'essai sur les algues permettait normalement d'effectuer une estimation raisonnablement précise au seuil de 10 % d'inhibition si les points dont on dispose sont en nombre suffisant — à moins qu'une stimulation ne survienne aux faibles concentrations, ce qui créerait une confusion. La précision de l'estimation de la CE_{20} est souvent bien meilleure que celle de la CE_{10} , parce que la CE_{20} se situe généralement sur la partie à peu près linéaire de la courbe concentration-effet centrale. Quelquefois, la CE_{10} peut être difficile à interpréter à cause de la stimulation de la croissance, de sorte que, même si la CE_{10} s'obtient généralement avec une précision suffisante, il est toujours recommandé de mentionner également la CE_{20} .

Facteurs de pondération

En général, la variance expérimentale n'est pas constante et inclut une composante proportionnelle, d'où l'intérêt de procéder d'office à une régression pondérée. Les facteurs de pondération s'appliquant à une telle analyse sont normalement supposés être inversement proportionnels à la variance:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

De nombreux programmes de régression permettent d'effectuer une analyse de régression pondérée avec des facteurs de pondération repris dans un tableau. Pour se simplifier la tâche, il faudrait normaliser les facteurs de pondération en les multipliant par $n/\sum w_i$ (n étant le nombre de points), de telle sorte que leur somme soit égale à un.

Normalisation des valeurs prises par les effets

La normalisation par la valeur moyenne de l'effet sur les témoins pose certains problèmes de principe et donne une structure de variance plutôt compliquée. En divisant les valeurs par la valeur moyenne des témoins en vue d'obtenir le pourcentage d'inhibition, on introduit une erreur supplémentaire due à l'erreur sur la moyenne des témoins. À moins que cette erreur ne soit négligeable, les facteurs de pondération appliqués à la régression et les limites de confiance doivent être corrigés en fonction de la covariance avec le témoin (17). Notons qu'il est important d'obtenir une précision élevée pour la moyenne estimée des valeurs affichées par les témoins, afin de minimiser la variance globale de l'effet relatif. Cette variance se calcule comme suit

▼ **M1**

(l'indice i fait référence au niveau de concentration i et l'indice 0 aux témoins):

$$Y_i = \text{effet relatif} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

avec une variance

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\delta Y_i / \delta r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\delta Y_i / \delta r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

et comme

$$(\delta Y_i / \delta r_i) = 1/r_0 \text{ et } (\delta Y_i / \delta r_0) = r_i/r_0^2$$

avec des données à distribution normale et des expériences identiques m_i et m_0 :

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

la variance totale de l'effet relatif Y_i devient donc

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 m_0$$

L'erreur sur la moyenne du témoin est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'expériences identiques du témoin prises en compte dans la moyenne, et il est quelquefois justifié d'inclure des données antérieures, ce qui réduit considérablement l'erreur. Il est également possible de ne pas normaliser les données ni d'ajuster les effets absolus, y compris l'effet affiché par le témoin, mais d'introduire la valeur de l'effet prise par le témoin en tant que paramètre supplémentaire à ajuster par une régression non linéaire. Avec une équation de régression ordinaire à deux paramètres, cette méthode requiert l'ajustement de trois paramètres et demande, par conséquent, plus de points qu'une régression non linéaire pratiquée sur des données normalisées à l'aide d'une valeur de l'effet prise par le témoin déterminée à l'avance.

Intervalle de confiance inverses

Le calcul des intervalles de confiance d'une régression non linéaire par une estimation inverse est assez complexe et ne figure généralement pas parmi les options livrées avec les programmes courants de calcul statistique. Des limites de confiance approximatives peuvent être obtenues avec des programmes classiques de régression non linéaire, à l'aide d'une reparamétrisation (Bruce et Versteeg, 1992), consistant à reformuler l'équation mathématique en prenant les estimations ponctuelles désirées, par exemple la CE_{10} et la CE_{50} , comme paramètres à estimer [soit la fonction $I = f(\alpha, \beta, \text{concentration})$, utilisons les relations de définition $f(\alpha, \beta, CE_{10}) = 0,1$ et $f(\alpha, \beta, CE_{50}) = 0,5$ pour remplacer $f(\alpha, \beta, \text{concentration})$ par une fonction équivalente $g(CE_{10}, CE_{50}, \text{concentration})$].

Il existe un calcul plus direct (Andersen et al., 1998) effectué en conservant l'équation d'origine et en appliquant une expansion de Taylor autour des moyennes de r_i et r_0 .

Les procédés par *bootstrap*, introduits récemment, sont appréciés. Ces procédés utilisent les données mesurées et un rééchantillonnage fréquent dirigé par un générateur de nombre aléatoire, pour estimer une distribution empirique de la variance.

Bibliographie

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Env. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B**C.4. DÉTERMINATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ «FACILE»****PARTIE I. GÉNÉRALITÉS****I.1. INTRODUCTION**

Six méthodes d'essai permettant d'évaluer la biodégradabilité facile de produits chimiques en milieu aqueux en aérobiose sont décrites:

- a) Disparition du carbone organique dissous (COD) (Méthode C.4-A)
- b) Essai de screening modifié de l'OCDE — Disparition du COD — (Méthode C.4-B)
- c) Dégagement de dioxyde de carbone (CO₂) (Essai Sturm modifié) (Méthode C.4-C)
- d) Respirométrie manométrique (Méthode C.4-D)
- e) Fiole fermée (Méthode C.4-E)
- f) MITI (ministère de l'industrie et du commerce international — Japon) (Méthode C.4-F)

La partie I contient des considérations d'ordre général ainsi que des considérations communes aux six essais. Les particularités propres à chaque méthode sont décrites dans les parties II à VII. Les annexes contiennent définitions, formules et données de référence.

Un exercice comparatif interlaboratoires de l'OCDE, réalisé en 1988, a montré que ces méthodes donnent des résultats comparables. Toutefois, l'une ou l'autre de ces méthodes peut être préférable en fonction des caractéristiques physiques de la substance.

I.2. CHOIX DE LA MÉTHODE APPROPRIÉE

Il est essentiel, pour choisir la méthode la mieux appropriée, de disposer d'informations concernant la solubilité, la pression de vapeur et les caractéristiques d'adsorption de la substance à étudier. Pour calculer la valeur théorique et/ou vérifier les valeurs mesurées d'un paramètre tel que la DThO, le CO₂Th, le COD, le COT et la DCO (voir annexes I et II), il est nécessaire de connaître la structure chimique ou la formule brute du produit.

Toutes ces méthodes sont applicables aux substances d'essai qui peuvent être dissoutes dans l'eau à des concentrations de 100 mg/l au moins, pourvu qu'elles ne soient ni volatiles ni adsorbables. Dans le cas de produits peu hydrosolubles, volatiles ou adsorbables, les méthodes appropriées sont indiquées dans le tableau 1. La manière de procéder avec les produits faiblement hydrosolubles et les substances volatiles est décrite à l'annexe III. Les substances modérément volatiles peuvent être étudiées à l'aide de la méthode de disparition du COD pourvu que les récipients d'essai contiennent un volume gazeux suffisant et qu'ils soient fermés de manière appropriée. Dans ce cas, un contrôle abiotique doit toutefois être prévu afin de tenir compte de toute perte physique.



Tableau 1

Limites d'application des méthodes d'essai

| Essai | Méthode analytique | Approprié pour les substances qui sont: | | |
|-------------------------------|--|---|-----------|-------------|
| | | faiblement solubles | volatiles | adsorbables |
| Disparition du COD | Carbone organique dissous | — | — | +/- |
| Screening modifié de l'OCDE | Carbone organique dissous | — | — | +/- |
| Dégagement de CO ₂ | Respirométrie: dégagement de CO ₂ | + | — | + |
| Respirométrie manométrique | Respirométrie manométrique: consommation d'oxygène | + | +/- | + |
| Fliale fermée | Respirométrie: oxygène dissous | +/- | + | + |
| MITI | Respirométrie: consommation d'oxygène | + | +/- | + |

L'interprétation des résultats obtenus nécessite des informations sur la pureté de la substance à étudier ou sur les proportions relatives de ses principaux composants, en particulier lorsque ces résultats sont faibles ou marginaux.

Il peut être extrêmement utile de disposer d'informations sur la toxicité du produit à étudier vis-à-vis des bactéries (annexe IV) pour choisir les concentrations d'essai appropriées et interpréter les résultats de biodégradation, notamment lorsque les valeurs sont peu élevées.

I.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La procédure est contrôlée à l'aide de substances de référence répondant aux critères de biodégradabilité facile. Ces substances sont étudiées parallèlement aux substances d'essai en ajoutant une fiole appropriée à la série normale d'essais.

Les produits chimiques adéquats sont l'aniline (fraîchement distillée), l'acétate de sodium et le benzoate de sodium. Ces produits de référence sont tous dégradés dans les conditions de ces méthodes, même si aucun inoculum n'est délibérément ajouté.

Il avait été suggéré de retenir un produit de référence qui soit facilement biodégradable, mais qui nécessite l'addition d'un inoculum. L'hydrogène-phtalate de potassium a été proposé mais le bien-fondé de son utilisation reste à démontrer, avant de l'accepter comme substance de référence.

Dans le cas des essais respirométriques, les composés azotés peuvent influencer la consommation d'oxygène du fait de la nitrification (voir les annexes II et V).

I.4. PRINCIPE DES MÉTHODES D'ESSAI

Une solution ou une suspension de la substance à étudier dans un milieu minéral estensemencée et incubée en aérobiose, dans l'obscurité ou sous lumière diffuse. La quantité de COD due à l'inoculum présente dans la solution d'essai doit être aussi faible que possible par rapport à la quantité de COD provenant de la substance à étudier. L'activité endogène de l'inoculum est estimée en effectuant parallèlement des essais à blanc avec l'inoculum mais sans addition de substance à étudier, quoique l'activité endogène des cellules en présence de la substance ne correspond pas exactement à celle de ce contrôle endogène. Un essai avec une substance de référence est effectué en parallèle pour vérifier le fonctionnement de ces procédures.

▼B

La dégradation est en général suivie par la détermination de paramètres comme le COD, la production de CO₂ ou la consommation d'oxygène et les mesures sont effectuées avec une fréquence suffisante pour permettre l'identification du commencement et de la fin de la biodégradation. Les respiromètres automatiques permettent d'effectuer des mesures en continu. Le COD est parfois mesuré en plus d'un autre paramètre, mais cela n'est généralement le cas qu'au début et à la fin de l'essai. Une analyse chimique spécifique peut également servir à évaluer la dégradation primaire de la substance à étudier et à déterminer la concentration de toutes les substances intermédiaires formées (obligatoire dans l'essai MITI).

L'essai dure normalement 28 jours. Un essai peut cependant être interrompu avant, dès lors que la courbe de biodégradation atteint un plateau qui se prolonge au moins sur trois mesures. Un essai peut également être prolongé au-delà de 28 jours si la courbe montre que la biodégradation a manifestement commencé sans toutefois avoir atteint un palier le 28^e jour.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ**1.5.1. Reproductibilité**

En raison de la nature de la biodégradation et de l'hétérogénéité des populations bactériennes utilisées comme inoculum, les mesures doivent être effectuées au moins en double.

On observe souvent que plus la concentration initiale des micro-organismes ajoutés au milieu d'essai est élevée, plus la variation entre les répétitions est faible. Des essais d'intercomparaison ont également montré que des variations importantes peuvent apparaître entre les résultats obtenus dans différents laboratoires, mais les résultats relatifs aux produits de référence facilement biodégradables sont généralement en bonne harmonie.

1.5.2. Validité de l'essai

Un essai est considéré comme valable si la différence entre les valeurs extrêmes en double de la mesure de la disparition du produit à étudier, au niveau du plateau, à la fin de l'essai ou à la fin de la fenêtre de 10 jours, est inférieure à 20 % et si le pourcentage de dégradation du produit de référence a atteint le niveau correspondant à une biodégradabilité facile en 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai devra être recommencé. En raison du caractère rigoureux de ces méthodes, un résultat peu élevé ne signifie pas nécessairement que la substance soumise à l'essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement; il indique seulement que d'autres études seront nécessaires pour en faire la preuve.

Si, lors d'un essai de toxicité effectué avec une solution contenant à la fois la substance à étudier et un produit de référence, la dégradation est inférieure à 35 % (établie d'après le COD) ou à 25 % (établie d'après la DThO ou le CO₂Th) au cours des 14 premiers jours, on peut estimer que le produit a un effet inhibiteur (voir également l'annexe IV). La série d'essais doit être recommencée, si possible en utilisant une concentration de substance à étudier plus faible et/ou une concentration d'inoculum plus élevée, sans toutefois dépasser 30 mg/l de matière en suspension.

1.6. PROCÉDURES ET PRÉPARATIONS GÉNÉRALES

Les conditions générales qui s'appliquent aux essais sont résumées dans le tableau 2. Les appareils et les conditions expérimentales spécifiques d'un essai particulier sont décrits ci-après dans les chapitres consacrés à chaque essai.



Tableau 2

conditions d'essai

| Essai | Disparition du COD | Dégagement de CO ₂ | Respirométrie manométrique | Screening modifié de l'OECD | Fiolé fermée | MITI (1) | |
|---|---|-------------------------------|----------------------------|---|--|--|-------------------|
| Concentration de la substance à étudier en: mg/l C mg/l COD mg/l DThOD | 10-40 | 10-20 | 100 50-100 | 10-40 | 2-10 5-10 | 100 | |
| Concentration de l'inoculum (approximative, en cellules/l) | ≤ 1e; 30 mg/l MES ou ≤ 1e; 100 ml/l d'effluent (10 ⁷ — 10 ⁸) | | | 0,5 ml/l d'effluent secondaire (10 ⁵) | jusqu'à 5 ml/l d'effluent (10 ⁴ — 10 ⁶) | 30 mg/l MES (10 ⁷ — 10 ⁸) | |
| Concentration d'éléments dans le milieu minéral (en mg/l): | | | | | | | |
| P | 116 | | | | | 11,6 | 29 |
| N | 1,3 | | | | | 0,13 | 1,3 |
| Na | 86 | | | | | 8,6 | 17,2 |
| K | 112 | | | | | 12,2 | 36,5 |
| Mg | 2,2 | | | | | 2,2 | 6,6 |
| Ca | 9,9 | | | | | 9,9 | 29,7 |
| Fe | 0,05 - 0,1 | | | | | 0,05 - 0,1 | 0,15 |
| pH | 7,4 ± 0,2 | | | | | | de préférence 7,0 |
| Température | 22 ± °C | | | | | | 25 ± 1 °C |

COD = Carbone Organique Dissout

DThOD = Demande Théorique en Oxygène

MES = Matières en Suspension

I.6.1. Eau de dilution

De l'eau désionisée ou distillée, exempte de substances toxiques à des concentrations inhibitrices (tels que des ions Cu⁺⁺), est utilisée. Elle ne contient pas plus de 10 % de la quantité de carbone organique introduite par la substance à étudier. L'eau d'essai doit être d'un haut degré de pureté afin d'éviter des valeurs élevées dans les essais à blanc. Des contaminations peuvent provenir non seulement des impuretés inhérentes, mais également des résines échangeuses d'ions et de matières provenant de la lyse des bactéries et des algues. Pour chaque série d'essais, n'utiliser qu'un même lot d'eau dont la teneur en COD doit être analysée au préalable. Une telle analyse n'est pas nécessaire pour l'essai en fiole fermée, mais la consommation en oxygène à partir de l'eau doit être faible.

▼B**I.6.2. Solutions mères de sels minéraux**

Les solutions de sels minéraux utilisées pour l'essai sont préparées à partir de solutions mères de concentration appropriée. Les solutions mères décrites ci-après peuvent être utilisées (avec différents facteurs de dilution) dans les méthodes de disparition du COD, de screening modifié de l'OCDE, de dégagement de CO₂, de respirométrie manométrique et dans l'essai en fiole fermée.

Les facteurs de dilution et, pour l'essai MITI, la préparation spécifique du milieu minéral sont mentionnés dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Solutions mères:

Les solutions mères suivantes sont préparées en utilisant des réactifs de qualité analytique:

- | | | |
|----|--|---------|
| a) | Dihydrogénophosphate de potassium KH ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| | Monohydrogénophosphate de potassium K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| | Monohydrogénophosphate de sodium dihydraté Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O | 33,40 g |
| | Chlorure d'ammonium NH ₄ Cl | 0,50 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4. | |
| b) | Chlorure de calcium, anhydre CaCl ₂ | 27,50 g |
| | ou chlorure de calcium dihydraté CaCl ₂ , 2 H ₂ O | 36,40 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| c) | Sulfate de magnésium heptahydraté, MgSO ₄ ,7 H ₂ O | 22,50 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| d) | Chlorure de fer (III) hexahydraté, FeCl ₃ , 6 H ₂ O | 0,25 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |

Note: Afin d'éviter d'avoir à préparer cette solution immédiatement avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g/l de sel disodique d'acide éthylènediaminotétra-acétique (EDTA).

I.6.3. Solutions mères de produits chimiques

Dissoudre, si la solubilité excède 1 g/l, par exemple, entre 1 et 10 g, selon les cas, de substance à étudier ou de substance de référence dans de l'eau désionisée et compléter le volume à 1 litre. Dans le cas contraire, préparer des solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement le produit au milieu minéral. Dans le cas de substances de plus faible solubilité, se référer à l'annexe III, mais noter que, dans l'essai MITI (Méthode C.4-F), aucun solvant ni émulsifiant ne doit être utilisé.

▼B**I.6.4. Inoculums**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées, effluents non chlorés, eaux de surface, sols, ou encore un mélange de ceux-ci. Pour les essais de disparition du COD, de dégagement de CO₂ et de respirométrie manométrique, si des boues activées sont utilisées, elles doivent provenir d'une station d'épuration ou d'une unité pilote traitant principalement des eaux ménagères. Il a été montré que les inoculums provenant d'autres sources donnent des résultats plus dispersés. Pour l'essai de screening modifié de l'OCDE et l'essai en fiole fermée, il convient d'utiliser un inoculum plus dilué ne contenant pas de floes de boue et la source la plus appropriée consiste en un effluent secondaire d'une station d'épuration des eaux résiduaires urbaines ou d'une installation à l'échelle du laboratoire. Pour l'essai MITI, l'inoculum, qui provient d'un mélange de plusieurs origines, est décrit dans le chapitre consacré à cet essai.

I.6.4.1. *Inoculum provenant de boues activées*

Recueillir un échantillon de boue activée dans le compartiment d'aération d'une station d'épuration traitant des eaux résiduaires ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement les eaux ménagères. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules par filtration à travers un tamis fin et conserver ensuite la boue en aérobiose.

Une autre possibilité consiste à laisser la boue sédimenter ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 mn) après avoir éliminé toutes les grosses particules. Écarter le surnageant. La boue peut être lavée dans le milieu minéral. Mettre la boue concentrée en suspension dans un milieu minéral de telle sorte que la concentration soit comprise entre 3 et 5 g/l de matière en suspension. Aérer la suspension jusqu'à son utilisation.

Les boues doivent provenir d'une station conventionnelle fonctionnant bien. Si elles proviennent d'une station d'épuration dont le débit est important ou si elles sont susceptibles de contenir des inhibiteurs, elles doivent être lavées. Laisser sédimenter ou centrifuger la boue remise en suspension par une agitation vigoureuse, écarter le surnageant et remettre la boue lavée en suspension dans un milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que l'on puisse considérer que la boue est exempte d'inhibiteur et de substrat en excès.

Prélever un échantillon de boue remise en suspension ou de boue non traitée juste avant son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières solides en suspension.

Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de matière solide en suspension) à l'aide d'un agitateur mécanique pendant 2 minutes à vitesse moyenne. Laisser décanter la boue homogénéisée pendant 30 minutes ou plus si besoin est, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison de 10 ml/l de milieu minéral.

I.6.4.2. *Autres sources d'inoculum*

L'inoculum peut provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire qui reçoit principalement des eaux ménagères. Recueillir un échantillon frais qui doit être maintenu en aérobiose pendant le transport. Laisser reposer pendant une heure ou filtrer à l'aide d'un papier filtre grossier et conserver le surnageant transvasé ou le filtrat en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. On peut utiliser jusqu'à 100 ml de ce type d'inoculum par litre de milieu.

▼B

L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Dans ce cas, recueillir un échantillon d'une eau de surface appropriée, par exemple de rivière ou de lac, et le maintenir en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. Si nécessaire, concentrer l'inoculum par filtration ou par centrifugation.

I.6.5. Préconditionnement des inoculums

Les inoculums peuvent être preconditionnés aux conditions expérimentales, mais non préadaptés au produit à étudier. Le preconditionnement consiste à aérer la boue activée dans un milieu minéral, ou l'effluent secondaire pendant une durée de 5 à 7 jours à la température de l'essai. Le preconditionnement permet parfois d'améliorer la précision des méthodes d'essai en réduisant les valeurs dans les essais à blanc. Il est inutile de preconditionner les inoculums destinés à l'essai MITI.

I.6.6. Contrôles abiotiques

Rechercher, si nécessaire, une dégradation abiotique éventuelle de la substance à étudier en déterminant la disparition du COD, la consommation d'oxygène ou le dégagement de dioxyde de carbone dans des témoins stériles ne contenant pas d'inoculum. La stérilisation est effectuée par filtration à travers une membrane (0,2 à 0,45 µm) ou par addition d'une substance toxique adéquate à une concentration appropriée. Si la filtration sur membrane est utilisée, prélever les échantillons de façon aseptique pour maintenir la stérilité. À moins que l'adsorption de la substance à étudier ait pu être exclue a priori, des essais où la biodégradation est mesurée par l'élimination de COD doivent comporter, particulièrement lorsqu'il s'agit d'inoculums provenant de boues activées, un témoin abiotique qui sera inoculé et additionné de l'agent stérilisant.

I.6.7. Nombre de fioles

Le nombre de fioles d'une série type est précisé dans les chapitres consacrés à ces essais.

Des fioles de type suivant peuvent être utilisées:

- pour la suspension d'essai: contenant la substance à étudier et l'inoculum,
- pour le blanc inoculum: ne contenant que l'inoculum,
- pour le contrôle de la procédure: contenant la substance de référence et l'inoculum,
- pour le témoin abiotique stérile: stérile et ne contenant que le produit à étudier (voir point I.6.6),
- pour le contrôle de l'adsorption: contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant,
- pour le contrôle de toxicité: contenant le produit à étudier, le produit de référence et l'inoculum.

Il est obligatoire de suivre le COD et/ou les autres paramètres parallèlement dans la suspension d'essai et dans l'essai à blanc contenant l'inoculum. Il est souhaitable de suivre également le COD en parallèle dans les autres fioles.

Toutefois, il se peut que cela ne soit pas toujours possible. S'assurer que le nombre d'échantillons ou de lectures est suffisant pour permettre de déterminer le pourcentage de disparition au cours de l'intervalle de temps de 10 jours.

▼B**I.7. ÉVALUATION DES DONNÉES**

Le pourcentage de dégradation, D_t , est calculé à l'aide des valeurs moyennes des doubles déterminations du paramètre dans le récipient d'essai et dans le blanc contenant l'inoculum. Les formules sont décrites dans les chapitres consacrés à chaque essai. L'évolution de la dégradation est représentée graphiquement sur un diagramme indiquant l'intervalle de temps de 10 jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage de disparition au terme de l'intervalle de temps de 10 jours et la valeur obtenue au plateau ou à la fin de l'essai, selon les cas.

Dans les essais de respirométrie, des composés contenant de l'azote peuvent affecter la consommation d'oxygène en raison de la nitrification (voir annexes II et V).

I.7.1. Estimation de la dégradation à l'aide de la détermination du COD

Pour pouvoir vérifier la validité de l'essai (voir I.5.2), le pourcentage de dégradation (D_t) à chaque instant t de prise d'un échantillon doit être calculé séparément pour les fioles contenant la substance à étudier en utilisant les valeurs moyennes de mesures en double du COD. Il se calcule à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t ,

C_o = concentration initiale moyenne de COD dans le milieu de cultureensemencé contenant la substance à étudier (mg COD/l),

C_t = concentration moyenne de COD dans le milieu de cultureensemencé contenant la substance à étudier, au temps t (mg COD/l),

C_{bo} = concentration initiale moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéralensemencé) (mg COD/l),

C_{bt} = concentration moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéralensemencé) au temps t (mg COD/l).

Toutes les concentrations sont mesurées expérimentalement.

I.7.2. Estimation de la dégradation à l'aide d'analyses spécifiques

Lorsque l'on dispose de données analytiques spécifiques, la biodégradation primaire est calculée grâce à la formule suivante:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t , soit normalement le 28^e jour,

S_a = quantité résiduelle de produit soumis à l'essai dans le milieuensemencé à l'issue de l'essai (mg),

S_b = quantité résiduelle de produit à étudier dans l'essai à blanc constitué d'eau/milieu auquel on aura uniquement ajouté le produit à étudier (mg).

▼B**I.7.3. Dégradation abiotique**

Lorsqu'on utilise un témoin abiotique stérile, le pourcentage de dégradation abiotique se calcule par la formule:

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

où:

$C_{s(0)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps 0,

$C_{s(t)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps t.

I.8. RAPPORT

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, comporter les renseignements suivants:

- produits à étudier et produits de référence ainsi que leur degré de pureté,
- conditions de l'essai,
- inoculum: nature et lieu(x) de prélèvement, concentration ainsi que tout traitement de préconditionnement,
- proportion et nature des déchets industriels présents dans les eaux d'égout, si elles sont connues,
- durée et température de l'essai,
- dans le cas où les produits à étudier sont faiblement solubles, le traitement appliqué,
- méthode d'essai appliquée; il convient de fournir les raisons scientifiques et l'explication de toute modification du mode opératoire,
- fiche de données,
- tout phénomène d'inhibition observé,
- toute dégradation abiotique observée,
- les données concernant les analyses chimiques spécifiques, si elles sont disponibles,
- les données concernant les analyses de substances intermédiaires, si elles sont disponibles,
- la courbe représentant le pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances soumises à l'essai et les substances de référence; la phase de latence, la phase de dégradation, l'intervalle de temps de 10 jours et la pente doivent être clairement indiqués (annexe I). Si l'essai a satisfait les critères de validité, on peut utiliser la moyenne des pourcentages de dégradation des fioles contenant la substance à étudier pour la courbe,
- le pourcentage de disparition à l'issue de l'intervalle de temps de 10 jours et au plateau ou à la fin de l'essai.

PARTIE II. ESSAI DE DISPARITION DU COD (Méthode C.4.-A)**II.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

Un volume mesuré de milieu minéralensemencé, contenant une concentration connue de substance à étudier (10 à 40 mg/l de COD) comme seule source de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse, à 22 ± 2 °C.

▼B

La dégradation est suivie en analysant le COD à des intervalles fréquents pendant une durée de 28 jours. Le degré de biodégradation est calculé en exprimant la concentration de COD disparu (à laquelle on apportera une correction correspondant à la concentration de COD disparu dans l'essai à blanc contenant l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de biodégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

II.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**II.2.1 Appareillage**

- a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 l, selon le volume requis pour l'analyse du COD;
- b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;
- c) un dispositif de filtration équipé des membranes adéquates;
- d) un analyseur du carbone organique dissous;
- e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;
- f) une centrifugeuse.

II.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation de la solution mère, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

II.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées, effluents, eaux de surface, sols ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 et I.6.5.

II.2.4. Préparation des fioles

Exemple: verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 l et ajouter dans des fioles distinctes un volume suffisant de solution mère de substance d'essai ou de substance de référence pour que la concentration de la substance corresponde à une concentration en COD comprise entre 10 et 40 mg/l. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les flacons avec de la boue activée ou avec un inoculum provenant d'une autre source (voir I.6.4.), de telle sorte que la concentration finale n'excède pas 30 mg/l de matière solide en suspension. Préparer également des témoins constitués de milieu minéral contenant l'inoculum mais sans substance d'essai ni substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour la détection d'un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations, à la fois de produit à étudier et de produit de référence, identiques à celles des autres fioles.

Ajouter, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance soumise à l'essai subit une dégradation abiotique (voir I.6.6).

▼B

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant d'évaluer l'importance probable de cette adsorption et par conséquent de déterminer si l'essai convient pour la substance concernée (voir tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque fiole afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir annexe II.4). Couvrir l'ouverture des fioles, par exemple avec du papier d'aluminium, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les fioles dans le dispositif d'agitation.

II.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2: suspension, d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: contrôle de l'adsorption

Fiole 8: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

II.2.6. Déroulement de l'essai

Pendant l'essai, les concentrations de COD font l'objet de doubles déterminations à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume de suspension d'essai strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (I.6.1). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois du récipient doivent être dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4); ils sont analysés le jour même; si tel n'est pas le cas, il faut les conserver entre 2 et 4 °C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de — 18 °C au-delà de 48 heures.

II.3. RÉSULTATS ET RAPPORT**II.3.1. Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t, selon les indications figurant au point I.7.1 (détermination du COD) et, éventuellement, au point I.7.2 (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

▼BII.3.2. **Validité des résultats**

Voir I.5.2.

II. **3.3. Rapport**

Voir I.8.

II.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est fourni ci-dessous.

ESSAI DE DISPARITION DU COD

1. **LABORATOIRE**2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: ...mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_0 : ...mg/l produit4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **DÉTERMINATION DU CARBONE**

Analyseur de carbone:

| | Fiole n° | | COD après n jours (mg/l) | | | | |
|-----------------------------------|----------|---------------------------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| Substance à étudier plus inoculum | 1 | a ₁ | | | | | |
| | | a ₂ | | | | | |
| | | a, moyenne C _{a(t)} | | | | | |
| | 2 | b ₁ | | | | | |
| | | b ₂ | | | | | |
| | | b, moyenne C _{b(t)} | | | | | |

▼B

| | Fiole n° | | COD après n jours (mg/l) | | | | |
|---|----------|------------------------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier | 3 | C ₁ | | | | | |
| | | C ₂ | | | | | |
| | | c, moyenne C _{c(t)} | | | | | |
| | 4 | d ₁ | | | | | |
| | | d ₂ | | | | | |
| | | d, moyenne C _{d(t)} | | | | | |
| $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | | |

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES

| Fiole n° | | % de dégradat. après n jours | | | | |
|-------------|---|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Moyenne (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Lorsque la différence entre les valeurs de D₁ et D₂ est trop grande, il ne faut pas calculer leur moyenne.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. CONTRÔLE ABIOTIQUE (facultatif)

| | Durée (en jours) | |
|--|-------------------|-------------------|
| | 0 | t |
| Concentration de COD (mg/l) dans le témoin stérile | C _{s(o)} | C _{s(t)} |

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALYSE SPÉCIFIQUE (facultative)

| | quantité résiduelle de substance à étudier | % de dégradation primaire |
|----------------|--|---------------------------|
| Témoin stérile | S _b | |

▼B

| | quantité résiduelle de substance à étudier | % de dégradation primaire |
|--------------------------|--|------------------------------------|
| Milieu d'essai contaminé | S_a | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

PARTIE III. ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE
(Méthode C.4-B)

III.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral contenant une concentration connue de substance à étudier (de 10 à 40 mg/l COD) comme unique source de carbone organique estensemencé avec un volume de 0,5 ml d'effluent par litre de milieu. Le mélange est aéré à 22 ± 2 °C dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse.

La dégradation est suivie grâce à l'analyse du COD à des intervalles rapprochés pendant une période de 28 jours. Le taux de biodégradation est calculé en exprimant la concentration en COD disparu (corrigeé en fonction de la quantité de COD disparu dans l'essai à blanc avec l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de dégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

III.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

III.2.1. Appareillage

- a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 l, selon le volume requis pour l'analyse du COD;
- b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;
- c) un appareillage de filtration, accompagné des membranes adéquates;
- d) un analyseur du carbone organique dissous;
- e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;
- f) une centrifugeuse.

III.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation de la solution mère, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec de l'eau de dilution.

Cette méthode ne nécessitant que 0,5 ml/l d'effluent comme inoculum, le milieu doit par conséquent être enrichi en oligoéléments et facteurs de croissance. On ajoute pour cela 1 ml de chacune des solutions ci-après par litre de milieu final.

▼B

Solution d'oligoéléments:

| | |
|--|----------|
| Sulfate de manganèse tétrahydraté, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 39,9 mg |
| Acide borique, H_3BO_3 | 57,2 mg |
| Sulfate de zinc heptahydraté, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 42,8 mg |
| Heptamolybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6 \text{MO}_7\text{O}_{24}$ | 34,7 mg |
| Fer-chélaté (FeCl_3 , EDTA) | 100,0 mg |

Dissoudre et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

Solution de vitamines:

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de levure | 15,0 mg |
|-------------------|---------|

Dissoudre l'extrait de levure dans 100 ml d'eau. Stériliser par passage à travers une membrane de porosité de 0,2 nm ou préparer une solution fraîche.

III.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit essentiellement des eaux ménagères. Voir I.6.4.2 et I.6.5.

On en utilise 0,5 ml par litre de milieu minéral.

III.2.4. Préparation des fioles

Exemple: verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 l et ajouter dans des fioles distinctes des volumes de solution mère de substance à étudier et de substance de référence tels que la concentration du produit soit comprise entre 10 et 40 mg/l de COD. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4.ensemencer les fioles avec un volume de 0,5 ml/l d'effluent d'eau d'égout (voir I.6.4.2). Préparer également des témoins en ajoutant l'inoculum au milieu minéral, mais sans addition de substance d'essai ou de substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela,ensemencer une solution contenant des concentrations de produit à étudier et de produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire, stérile, contenant une solution de substance non ensemencée afin de vérifier si la substance à étudier subit une dégradation abiotique (voir I.6.6).

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant de déterminer l'importance vraisemblable de l'adsorption et d'évaluer par conséquent si l'essai convient pour la substance concernée (voir tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque flacon afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir annexe II.4). Recouvrir les fioles avec une feuille d'aluminium, par exemple, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les récipients dans le dispositif d'agitation.

▼B**III.2.5. Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si besoin est:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: contrôle de l'adsorption

Fiole 8: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

III.2.6. Déroulement de l'essai

Au cours de l'essai, les concentrations de COD dans chaque fiole font l'objet d'une double détermination à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (I.6.1). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois des récipients sont dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4). Ils sont analysés le jour même, si tel n'est pas le cas, il faut les conserver entre 2 et 4 °C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de — 18 °C au-delà de 48 heures.

III.3. RÉSULTATS ET RAPPORT**III.3.1. Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t , selon les indications figurant au point I.7.1 (détermination du COD) et, éventuellement, au point I.7.2 (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

III.3.2. Validité des résultats

Voir I.5.2.

III. 3.3. Rapport

Voir I.8.

III.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE TRIAGE DE L'OCDE MODIFIÉ**1. LABORATOIRE****2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

▼B**3. SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_0 : mg/l produit**4. INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. DÉTERMINATION DU CARBONE

Analyseur de carbone:

| | Fiole n° | | COD après n jours (mg/l) | | | | |
|---|---|--------------------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| Substance à étudier plus inoculum | 1 | a ₁ | | | | | |
| | | a ₂ | | | | | |
| | | a, moyenne $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | b ₁ | | | | | |
| | | b ₂ | | | | | |
| | | b, moyenne $C_{b(t)}$ | | | | | |
| Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier | 3 | C ₁ | | | | | |
| | | C ₂ | | | | | |
| | | c, moyenne $C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 4 | d ₁ | | | | | |
| | | d ₂ | | | | | |
| | | d, moyenne $C_{d(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES

| Fiole n° | | % de dégradat. après n jours | | | | |
|----------|---|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |

▼B

| Fiole n° | | % de dégradat. après n jours | | | | |
|-------------|---|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Moyenne (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D₁ et D₂ lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. CONTRÔLE ABIOTIQUE (facultatif)

| | Durée (en jours) | |
|--|-------------------|-------------------|
| | 0 | t |
| Concentration de COD (mg/l) dans le témoin stérile | C _{s(0)} | C _{s(t)} |

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. ANALYSE SPÉCIFIQUE (facultative)

| | quantité résiduelle de substance à étudier | % de dégradation primaire |
|--------------------------|--|------------------------------------|
| Témoin stérile | S _b | |
| Milieu d'essai contaminé | S _a | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

PARTIE IV. ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO₂ (Méthode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance à étudier (10 à 20 mg/l de COD ou de COT) comme seule source de carbone organique, est aéré par le passage d'air exempt de dioxyde de carbone, à un débit contrôlé et dans l'obscurité ou en lumière diffuse. La dégradation est suivie pendant une durée de 28 jours en déterminant le dioxyde de carbone produit, qui est piégé par de l'hydroxyde de sodium ou de baryum et mesuré par titration de l'hydroxyde résiduel ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produite à partir de la substance à étudier (corrigée en fonction de la quantité produite dans l'essai à blanc avec l'inoculum) est exprimée en pourcentage du CO₂Th. Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation.

▼B

IV.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

IV.2.1. **Appareillage**

- a) des fioles d'une contenance de 2 à 5 litres, munies d'un tube d'aération atteignant presque le fond du récipient et d'un orifice de sortie;
- b) des agitateurs magnétiques pour les essais avec des substances peu solubles;
- c) des flacons absorbeurs de gaz;
- d) un dispositif de contrôle et de mesure du débit d'air;
- e) un appareil de lavage du dioxyde de carbone, permettant d'obtenir de l'air exempt de dioxyde de carbone; une autre possibilité consiste à utiliser un mélange d'oxygène et d'azote exempts de CO₂, provenant de bouteilles de gaz, dans des proportions adéquates (20 % O₂, 80 % N₂);
- f) un dispositif de mesure du dioxyde de carbone, soit par titrimétrie, soit à l'aide d'un analyseur de carbone inorganique quelconque;
- g) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif);
- h) un analyseur de COD (facultatif).

IV.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

IV.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 et I.6.5.

IV.2.4. **Préparation des fioles**

Les volumes et poids cités ci-après à titre d'exemple indiquent des valeurs correspondant à des fioles de 5 l contenant 3 l de suspension. Si de plus petits volumes sont utilisés, il convient de modifier les valeurs en conséquence, mais en s'assurant que le dioxyde de carbone formé peut être mesuré avec précision.

Verser 2 400 ml de milieu minéral dans chaque fiole de 5 l. Ajouter un volume approprié de boue activée préparée au préalable (voir I.6.4.1 et I.6.5) tel que la concentration des matières en suspension n'exécède pas 30 mg/l dans le volume final de 3 l de mélangeensemencé. Une autre possibilité consiste à diluer d'abord la boue préparée jusqu'à obtention d'une suspension de 500 à 1 000 mg/l dans le milieu minéral, puis à ajouter une partie aliquote de cette suspension dans la fiole de 5 l, de manière à atteindre une concentration de 30 mg/l; cette méthode permet une plus grande précision. On peut utiliser des inoculums d'origines différentes (voir I.6.4.2).

Éliminer le dioxyde de carbone du mélangeensemencé par barbotage d'air exempt de CO₂, pendant une nuit.

▼B

Ajouter séparément des volumes connus de solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence dans des fioles préparées en double, de telle sorte que la concentration de COD ou de COT, provenant des substances ajoutées, soit comprise entre 10 et 20 mg/l; conserver quelques fioles sans addition de substance comme témoins d'ensemencement. Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les indications données à l'annexe III.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemercer une solution contenant des concentrations du produit à étudier et du produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance d'essai subit une dégradation abiotique (voir I.6.6). Stériliser par addition d'une substance toxique à une concentration appropriée.

Compléter le volume des suspensions à 3 litres, dans toutes les fioles, avec le milieu minéral aéré au préalable au moyen d'air exempt de CO₂. Des échantillons peuvent (facultatif) être prélevés afin d'analyser le COD (voir annexe II.4) et/ou d'effectuer une analyse spécifique. Relier les flacons absorbeurs à l'orifice de sortie d'air des fioles.

Si l'on utilise de l'hydroxyde de baryum, à chacune des fioles de 5 litres, relier en série trois flacons absorbeurs, contenant chacun 100 ml d'une solution 0,0125 M d'hydroxyde de baryum. La solution ne doit contenir ni sulfate ni carbonate précipité et il convient d'en déterminer la teneur juste avant son utilisation. Si l'on utilise de l'hydroxyde de sodium, relier deux pièges, le second servant de contrôle pour montrer que tout le dioxyde de carbone a été absorbé dans le premier. On pourra utiliser des flacons absorbeurs munis de systèmes de fermeture pour flacons de sérum. Ajouter dans chaque flacon 200 ml d'hydroxyde de sodium 0,05 M, ce qui suffit à absorber la totalité du dioxyde de carbone dégagé lors de la dégradation complète de la substance à étudier. La solution d'hydroxyde de sodium, même fraîchement préparée, contiendra des traces de carbonate; il convient donc d'effectuer une correction en déduisant la quantité de carbonate présente dans le témoin.

IV.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

IV.2.6. Déroulement de l'essai

Commencer l'essai en faisant barboter de l'air exempt de CO₂ dans les suspensions à un débit de 30-100 ml/min. Prélever régulièrement des échantillons de l'absorbant de dioxyde de carbone pour en analyser la teneur en CO₂. Il est conseillé d'effectuer des analyses tous les deux ou trois jours pendant les dix premiers jours, puis ensuite tous les cinq jours jusqu'au 28^e jour de telle sorte que l'intervalle de temps de 10 jours puisse être identifié.

▼B

Le 28^e jour, prélever des échantillons (facultatif) pour analyser le COD et/ou effectuer une analyse spécifique, mesurer le pH des suspensions et ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré à chaque fiole; aérer la fiole pendant une nuit pour éliminer le dioxyde de carbone présent dans la suspension d'essai. Le 29^e jour, analyser pour la dernière fois le dégagement de dioxyde de carbone.

Les jours où l'on effectue les mesures de CO₂, détacher le flacon absorbeur contenant de l'hydroxyde de baryum le plus proche de la fiole d'essai et titrer la solution d'hydroxyde de baryum à l'aide d'HCl 0,05 M en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur. Rapprocher les autres flacons absorbeurs en les décalant d'une place et introduire un nouveau flacon absorbeur contenant 100 ml d'hydroxyde de baryum 0,0125 M frais à l'extrémité de la série. Effectuer les titrations nécessaires, par exemple lorsqu'une précipitation importante se produit dans le premier piège et avant qu'elle n'apparaisse dans le second, ou au moins une fois par semaine. Une autre possibilité consiste à utiliser le NaOH comme absorbant et à prélever à l'aide d'une seringue un échantillon de faible volume (en fonction du type d'analyseur de carbone utilisé) de la solution d'hydroxyde de sodium qui se trouve dans le flacon absorbeur le plus proche de la fiole. Injecter l'échantillon dans la partie CI de l'analyseur de carbone pour analyser directement le dioxyde de carbone dégagé.

N'analyser le contenu du second piège qu'à la fin de l'essai afin d'apporter une correction correspondant à tout passage de dioxyde de carbone dans ce piège.

IV.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

IV.3.1. Traitement des résultats

Lorsqu'une titration est effectuée, la quantité de CO₂ piégée dans un flacon absorbeur est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

où:

V = volume de HCl utilisé pour la titration des 100 ml contenus dans le flacon absorbeur (ml),

C_B = concentration de la solution d'hydroxyde de baryum (M),

C_A = concentration de la solution d'acide chlorhydrique (M),

si C_B est 0,0125 M et C_A est 0,05 M, la titration d'un volume de 100 ml d'hydroxyde de baryum est de 50 ml et le poids de CO₂ est donné par la formule suivante:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml d'HCl titré} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Ainsi, dans ce cas, le facteur permettant de convertir le volume d'HCl titré en mg de CO₂ est égal à 1,1.

Calculer le poids de CO₂ produit par l'inoculum seul et par l'inoculum plus la substance à étudier à l'aide des valeurs de titration obtenues dans les deux cas; la différence correspond au poids de CO₂ produit à partir de la substance à étudier seule.

Exemple: si la titration du flacon absorbeur correspondant à l'inoculum seul nécessite un volume de 48 ml et celui du flacon correspondant à l'inoculum additionné à la substance, un volume de 45 ml:

$$\text{CO}_2 \text{ de l'inoculum} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 de l'inoculum plus substance à étudier = $1,1 \times (50-45) = 5,5$ mg

et par conséquent le poids de CO_2 produit à partir de la substance à étudier est égal à 3,3 mg.

Le pourcentage de dégradation est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ produit} \times 100}{\text{CO}_2\text{Th} \times \text{mg substance à étudier ajoutée}}$$

ou

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{mg CO}_2 \times 100}{\text{mg de COT ajouté dans l'essai} \times 3,67}$$

où 3,67 est le facteur de conversion (44/12) du carbone en dioxyde de carbone.

Calculer le pourcentage de dégradation après un temps déterminé en effectuant la somme des pourcentages de CO_2Th calculés pour chaque jour où des mesures ont été effectuées pendant la période considérée.

Lorsque l'absorbant utilisé est de l'hydroxyde de sodium, calculer la quantité de dioxyde de carbone produite, exprimée en CI (mg), en multipliant la concentration en CI dans l'absorbant par le volume de ce dernier.

Calculer le pourcentage de dégradation à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ CO}_2\text{Th} = \frac{\text{mg CI de la fiole d'essai} - \text{mg CI de la fiole témoin}}{\text{mg de COT ajouté sous forme de substance d'essai}} \times 100$$

Calculer la disparition du COD (facultatif) comme décrit au point I.7. Consigner ces résultats, ainsi que tout autre résultat, sur les fiches de données fournies.

IV.3.2 Validité des résultats

La teneur en CI de la suspension de substance à étudier en milieu minéral au début de l'essai doit être inférieure à 5 % du CT, et le dégagement total de CO_2 dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit normalement pas excéder 40 mg/l de milieu à la fin de l'essai. Si les valeurs obtenues sont supérieures à 70 mg/l de CO_2 , les données et le protocole expérimental doivent être soumis à un examen critique.

Voir également I.5.2.

IV. 3.3 Rapport

Voir I.8.

IV.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI DE DÉGAGEMENT DE DIOXYDE DE CARBONE

1. **LABORATOIRE**
2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**
3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l produit

▼B

Concentration initiale dans le milieu: mg/l produit

Carbone total ajouté dans la fiole: mg/l

CO₂Th: mg CO₂

4. INOCULUM

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. PRODUCTION DE DIOXYDE DE CARBONE ET DÉGRADABILITÉ

Méthode: Ba(OH)₂NaOH/autre

| Temps (jours) | CO ₂ formé Essai (mg) | | CO ₂ formé blanc (mg) | | CO ₂ formé cumulé (mg) (essai moins blanc) | | % CO ₂ Th $\frac{\text{CO}_2\text{cumulé}}{\text{CO}_2\text{Th}} \times 100$ | | |
|----------------|----------------------------------|------|----------------------------------|------|---|---|---|---|------|
| | 1 2 | moy. | 3 4 | moy. | 1 | 2 | 1 | 2 | moy. |
| 0 | | | | | | | | | |
| n ₁ | | | | | | | | | |
| n ₂ | | | | | | | | | |
| n ₃ | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | |

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. DÉTERMINATION DU CARBONE (facultative)

Analyseur de carbone: ...

| Temps (jours) | Blanc mg/l | Produit à étudier mg/l |
|---------------|-------------------|------------------------|
| 0 | C _{b(o)} | c _o |
| 28 (*) | C _{b(t)} | c _t |

(*) ou à la fin de l'incubation

▼B

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultative)

$$\% \text{ dégrad. abiot.} = \frac{\text{Format. de CO}_2 \text{ d. la fiole stérile ap. 28 jours (mg)}}{\text{CO}_2\text{Th (mg)}} \times 100$$

PARTIE V. ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE
(Méthode C.4-D)**V.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance d'essai (100 mg/l de substance d'essai, de telle sorte que la DThO soit au moins comprise entre 50 et 100 mg/l au moins) comme seule source de carbone organique, est agité en fiole fermée, à température constante (± 1 °C au maximum) pendant une durée maximale de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée soit en mesurant la quantité d'oxygène (produit par électrolyse) nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans la fiole respirométrique, soit en se basant sur les modifications de volume ou de pression (ou sur une combinaison des deux) dans l'appareil. Le dioxyde de carbone produit est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la substance à étudier (après une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par le témoin inoculum, analysée parallèlement) est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO. Facultativement, la biodégradation primaire peut également être calculée à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation, et la biodégradation ultime par la mesure du COD.

V.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**V.2.1. Appareillage**

- a) un respiromètre approprié,
- b) un dispositif de régulation de température d'une précision de ± 1 °C au moins,
- c) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif),
- d) un analyseur de carbone (facultatif).

V.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution (a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions (b) à (d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

V.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. et I.6.5.

V.2.4. Préparation des fioles

À partir des solutions mères, préparer différents lots de solutions de substance d'essai et de substance de référence dans du milieu minéral, normalement à une concentration de 100 mg/l de substance (ce qui donne une DThO comprise, au moins, entre 50 et 100 mg/l).

▼B

Calculer la DThO à partir de la formation de sels d'ammonium, à moins qu'un processus de nitrification ne soit prévisible, auquel cas le calcul reposera sur la formation de nitrate (voir annexe II.2.)

Mesurer le pH et, le cas échéant, l'ajuster à $7,4 \pm 0,2$.

Les substances faiblement solubles doivent être ajoutées lors d'une étape ultérieure (voir ci-après).

S'il convient de déterminer la toxicité de la substance à étudier, préparer une solution de milieu minéral supplémentaire contenant à la fois la substance de référence et le produit à étudier aux mêmes concentrations que dans les solutions ne contenant que l'un des produits.

Dans le cas où il est nécessaire de mesurer la consommation physico-chimique d'oxygène, préparer une solution de produit à étudier, dont la concentration corresponde normalement à une DThO de 100 mg/l, stérilisée par l'addition d'une substance toxique appropriée (voir I.6.6).

Ajouter dans deux fioles, au moins, le volume requis de solution d'essai et dans deux autres, au moins, le volume adéquat de solution de référence. Préparer d'autres fioles ne contenant que du milieu minéral (pour les témoins inoculum) et, le cas échéant, la solution de mélange produit à étudier/substance de référence et la solution stérile.

Si la substance à étudier est peu soluble, en ajouter un poids ou un volume déterminé, directement à ce stade, ou suivre le mode opératoire décrit à l'annexe III. Ajouter de l'hydroxyde de potassium, de la chaux sodée ou un autre absorbant dans les compartiments d'absorption du CO₂.

V.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure de préférence,

et si nécessaire:

Fiole 6: témoin stérile

Fiole 7: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

V.2.6. Déroulement de l'essai

Laisser les récipients atteindre la température souhaitée. Ensemencer les récipients appropriés avec les boues activées préparées au préalable ou avec un inoculum provenant d'une autre source, de telle sorte que la concentration des matières solides en suspension ne dépasse pas 30 mg/l. Assembler le matériel, mettre l'agitateur en marche, vérifier l'étanchéité à l'air et commencer à mesurer la consommation d'oxygène. Le déroulement de l'essai ne nécessite normalement aucune attention particulière en dehors des lectures et des vérifications quotidiennes permettant de s'assurer que la température et l'agitation appropriées sont maintenues.

Calculer la consommation d'oxygène à partir des lectures effectuées à intervalles réguliers et rapprochés en suivant la méthode fournie par le fabricant du matériel utilisé. A la fin de l'incubation, qui est normalement de 28 jours, mesurer le pH dans les fioles, en particulier si la consommation d'oxygène est faible ou supérieure à la DThO_{NH4} (pour les composés azotés).

▼B

Prélever, si nécessaire, des échantillons dans les fioles du respiromètre, au début et à la fin de l'essai, pour analyser le COD ou effectuer un dosage spécifique (voir annexe II.4.). Lors du premier prélèvement, noter le volume de suspension d'essai restant dans la fiole. Si la substance à étudier contient de l'azote, déterminer l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de ces 28 jours et calculer la correction relative à la consommation d'oxygène due à la nitrification (annexe V).

V.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

V.3.1. Traitement des résultats

Diviser la consommation d'oxygène (mg) de la substance à étudier après une période donnée (après correction due à l'oxygène consommé dans l'essai à blanc contenant l'inoculum pendant une période identique) par le poids de substance utilisé. Le résultat, exprimé en mg d'oxygène par mg de substance, correspond à la DBO, à savoir:

$$DBO = \frac{(\text{mg d'O}_2 \text{ consom. par le produit à étudier} - \text{mg O}_2 \text{ consom. par le blanc})}{(\text{mg de produit à étudier présent dans la fiole})}$$

= mg d'O₂ par mg de produit à étudier

Calculer le pourcentage de biodégradation, soit à partir de la formule suivante:

$$\% \text{ de biodégrad.} = \% \text{ DThO} = \frac{DBO(\text{mg O}_2/\text{mg substance})}{\text{DThO}(\text{mg O}_2/\text{mg substance})} \times 100,$$

soit à l'aide de celle-ci:

$$\% \text{ DCO} = \frac{DBO(\text{mg O}_2/\text{mg substance})}{\text{COD}(\text{mgO}_2/\text{mg substance})} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes n'aboutissant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Pour les substances à étudier azotées, choisir la DThO appropriée (NH₄ ou NO₃) en fonction de ce que l'on sait ou suppose quant à la nitrification (annexe II.2.). Si la nitrification a lieu mais de manière incomplète, calculer la correction pour l'oxygène consommé par la nitrification à partir des modifications des concentrations de nitrite et de nitrate (annexe V).

Lorsque les mesures facultatives du carbone organique et/ou d'un produit spécifique sont effectuées, calculer le pourcentage de dégradation, comme décrit au paragraphe 1.7.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

V.3.2. Validité des résultats

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg/l d'O₂ et ne doit pas dépasser 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se situe en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par le produit à étudier est inférieure à 60 %, l'essai doit être recommencé avec une concentration en produit à étudier plus faible.

Voir également 1.5.2.

▼B

| | | Temps (jours) | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------------------|---------------|--|---|--|----|--|--|----|--|--|----|--|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| % de dégrad. $\frac{DBO}{D_{ThO}} \times 100$ | D ₁ (a ₁) | | | | | | | | | | | | |
| | D ₂ (a ₂) | | | | | | | | | | | | |
| | Moyenne (*) | | | | | | | | | | | | |

V = volume de milieu dans la fiole d'essai

(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D₁ et D₂ lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION (voir annexe V)

| Jour | | 0 | 28 | Différence |
|-----------|--|---|----|------------|
| i) | Concentration de nitrate (mg N/l) | | | (N) |
| ii) | Équivalent oxygène ($4,57 \times N \times V$) (mg) | — | — | |
| iii) | Concentration de nitrite (mg N/l) | | | (N) |
| (iv) | Équivalent oxygène ($3,43 \times N \times V$) (mg) | — | — | |
| (ii + iv) | Total équivalent oxygène | — | — | |

7. ANALYSE DU CARBONE (facultative)

Analyseur de carbone: ...

| Temps (jour) | Blanc mg/l | Produit à étudier mg/l |
|--------------|---------------------|------------------------|
| 0 | (C _{blo}) | (C _o) |
| 28 (*) | (C _{blt}) | (C _t) |

(*) ou à la fin de l'incubation

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. ANALYSE SPÉCIFIQUE (facultative)

S_b = concentration dans le témoin physico-chimique (stérile), le 28^e jour.

S_a = concentration dans la fioleensemencée, le 28^e jour.

$$\% \text{ de biodégradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultative)

a = consommation d'oxygène dans les fioles stériles au bout de 28 jours (mg).

$$\text{Consommation d'oxygène par mg de produit à étudier} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(Voir paragraphe 1 et 3)

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times DThO}$$

PARTIE VI. ESSAI EN FIOLES FERMÉES (Méthode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La solution de substance à étudier en milieu minéral, généralement d'une concentration de 2 à 5 mg/l, estensemencée avec un nombre relativement faible de micro-organismes provenant d'une population hétérogène et conservée dans des fioles fermées et remplies complètement dans l'obscurité et à température constante. La dégradation est suivie par l'analyse de l'oxygène dissous pendant une période de 28 jours. La quantité d'oxygène consommé par la substance à étudier, corrigée en fonction de la consommation dans l'essai à blanc contenant l'inoculum réalisé dans la même série, est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO.

VI.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

VI.2.1. Appareillage

- a) des flacons pour analyse de la DBO, munis de bouchons de verre, d'un volume de 250 à 300 ml,
- b) un bain-marie ou un incubateur permettant de maintenir les fioles à température constante (± 1 °C au maximum) à l'abri de la lumière,
- c) de grands flacons de verre (2 à 5 l) pour la préparation des milieux et le remplissage des flacons à DBO,
- d) une électrode à oxygène couplée à un appareil de mesure, ou l'équipement et les réactifs nécessaires à la méthode de titration de Winkler.

VI.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 1 ml des solutions a) à d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

VI.2.3. Préparation de l'inoculum

Normalement, l'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit principalement des eaux ménagères. L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Utiliser normalement une goutte (0,05 ml) à 5 ml de filtrat par litre de milieu; il peut être nécessaire de procéder à des essais afin de déterminer le volume optimal pour un effluent donné (voir I.6.4.2. et I.6.5.)

VI.2.4. Préparation des fioles

Aérer fortement le milieu minéral pendant au moins 20 mn. Chaque série d'essais doit être effectuée avec du milieu minéral provenant d'un lot unique. Le milieu est généralement prêt à l'emploi après être resté pendant 20 heures à la température de l'essai. Déterminer la concentration d'oxygène dissous à des fins de contrôle; la valeur obtenue doit être proche de 9 mg/l à 20 °C. Effectuer toutes les opérations de transfert et de remplissage avec le milieu saturé d'air en évitant la formation de bulles, par exemple à l'aide de siphons.

▼B

Préparer des lots parallèles de flacons à DBO pour les déterminations avec la substance d'essai et la substance de référence dans des séries expérimentales simultanées. Réunir un nombre suffisant de flacons à DBO, comprenant des essais à blanc avec l'inoculum, pour pouvoir effectuer, au moins en double, les mesures de la consommation d'oxygène aux intervalles de temps souhaités, par exemple après 0, 7, 14, 21 et 28 jours. Un plus grand nombre de flacons peut être nécessaire pour être sûr de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Transférer le milieu minéral parfaitement aéré dans les grands flacons de manière à remplir à peu près le tiers de leur volume. Ajouter ensuite dans de grands flacons distincts une quantité de solution mère du produit à étudier ou du produit de référence telle que la concentration finale ne dépasse pas, normalement, 10 mg/l. N'ajouter aucune substance dans le grand flacon destiné à l'essai à blanc.

Pour s'assurer que l'activité de l'inoculum n'est pas limitée, la concentration d'oxygène dissous ne doit pas descendre en-dessous de 0,5 mg/l dans les flacons à DBO. La concentration de produit à étudier se trouve ainsi limitée à environ 2 mg/l. Toutefois, on peut utiliser une concentration comprise entre 5 et 10 mg/l pour les composés peu dégradables et les composés dont la DThO est faible. Dans certains cas, il est préférable d'effectuer des séries d'essais en parallèle avec deux concentrations différentes, par exemple 2 et 5 mg/l. La DThO est normalement calculée à partir de la formation de sels d'ammonium, mais si l'on suppose ou si l'on est sûr qu'une nitrification doit avoir lieu, il convient alors de calculer la $DThO_{NO_3}$ en se basant sur la formation de nitrate (voir annexe II.2). Toutefois, si une nitrification se produit mais sans être complète, il faut effectuer une correction tenant compte des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate déterminées par l'analyse (voir annexe V).

Si la toxicité du produit à étudier doit être recherchée (dans le cas, par exemple, où une faible biodégradabilité aurait été observée au préalable), une autre série de flacons est nécessaire.

Préparer un autre grand flacon contenant du milieu minéral aéré (jusqu'au tiers de son volume environ) auquel on ajoute la substance à étudier et le produit de référence à des concentrations finales normalement égales à celles des autres grands flacons.

Ensemencer les solutions contenues dans les grands flacons avec un effluent secondaire (dont le volume est compris entre une goutte, soit environ 0,05 ml, et 5 ml) ou avec un inoculum d'une autre origine, comme de l'eau de rivière (voir I.6.4.2.). Enfin, compléter le volume des solutions avec du milieu minéral aéré à l'aide d'un tuyau touchant le fond du flacon pour permettre un mélange adéquat.

VI.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Une série type comporte les flacons suivants:

- au moins 10 flacons contenant la substance à étudier et l'inoculum (suspension d'essai),
- au moins 10 flacons ne contenant que l'inoculum (essai à blanc avec l'inoculum),
- au moins 10 flacons contenant le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure),

▼B

- et, si nécessaire, 6 flacons contenant la substance à étudier, le produit de référence et l'inoculum (contrôle de toxicité). Néanmoins, pour être certain de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours, il faudrait environ deux fois plus de flacons.

VI.2.6. Déroulement de l'essai

Toutes les solutions préparées sont immédiatement transférées dans le lot correspondant de flacons à DBO à l'aide d'un tuyau plongeant aux trois quarts (pas jusqu'au fond) du grand flacon approprié de telle sorte que tous les flacons à DBO soient complètement remplis. Tapoter doucement pour éliminer toutes les bulles d'air. L'oxygène dissous est analysé immédiatement dans les flacons destinés à la mesure au temps 0, par la méthode de Winkler ou avec une électrode. Le contenu des flacons peut être conservé en vue d'une analyse ultérieure par la méthode de Winkler si on lui ajoute du sulfate de manganèse (II) et de l'hydroxyde de sodium (le premier réactif de la méthode de Winkler). Les flacons dont le contenu en oxygène est fixé sous forme d'hydroxyde de manganèse (III) brun, sont conservés soigneusement fermés à l'obscurité, et à une température comprise entre 10 et 20 °C. Ne pas attendre plus de 24 heures avant de procéder aux étapes suivantes de la méthode de Winkler. Fermer les autres flacons préparés parallèlement en s'assurant qu'ils ne contiennent pas de bulles d'air et les incubent à 20 °C à l'obscurité. Chaque série doit être accompagnée d'une série complète d'essais à blancensemencés pour la détermination du témoin inoculum. Prélever régulièrement (au moins chaque semaine) deux flacons au moins dans chaque série, afin d'analyser l'oxygène dissous pendant la durée de l'incubation qui est de 28 jours.

Les prélèvements hebdomadaires d'échantillons permettent de déterminer le pourcentage de disparition dans un intervalle de 14 jours, alors que les prélèvements effectués tous les 3 ou 4 jours, qui nécessitent environ deux fois plus de flacons, permettent d'identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Si la substance à étudier contient de l'azote, il convient d'effectuer une correction pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification. Pour cela, déterminer la concentration d'oxygène dissous par la méthode de l'électrode à O₂ et, ensuite, analyser la teneur en nitrite et en nitrate sur un échantillon prélevé dans le flacon DBO. Calculer la quantité d'oxygène utilisée sur la base de l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate (voir annexe V).

VI.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

VI.3.1. Traitement des résultats

En premier lieu, calculer la DBO après chaque période de temps en soustrayant la perte en oxygène (mg O₂/l) dans l'essai à blanc contenant l'inoculum de celle que l'on observe avec la substance à étudier. Diviser cette perte en oxygène ainsi corrigée par la concentration (mg/l) de la substance à étudier. Le résultat obtenu correspond à la DBO spécifique exprimée en mg d'oxygène par mg de substance d'essai. Calculer le pourcentage de biodégradabilité en divisant la DBO spécifique par la DThO spécifique (calculée selon les indications données à l'annexe II.2) ou par la DCO (déterminée par analyse, voir annexe II.3).

Ainsi:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ consommé par la substance à étudier} - \text{mg O}_2 \text{ consommé par le blanc}}{\text{mg de substance à étudier dans la fiole}}$$

▼B

= mg d'O₂ par mg de produit à étudier

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{DBO (mg O}_2\text{/mg de substance à étudier)}}{\text{DThO (mg O}_2\text{/mg de substance à étudier)}} \times 100$$

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{DBO (mg O}_2\text{/mg de substance à étudier)}}{\text{DCO (mg O}_2\text{/mg de substance à étudier)}} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes ne conduisant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Dans le cas où la substance d'essai contient de l'azote, il convient d'utiliser la DThO appropriée (NH₄ ou NO₃) en fonction des connaissances ou des prévisions concernant l'éventualité de la nitrification (annexe II.2.). Si une nitrification a lieu sans toutefois être complète, corriger pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification à partir des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate (annexe V).

VI.3.2. Validité des résultats

La perte d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit pas dépasser 1,5 mg/l d'oxygène dissous après 28 jours. Des valeurs supérieures nécessitent une vérification des méthodes expérimentales. La concentration résiduelle d'oxygène dans les flacons d'essai ne doit à aucun moment descendre au-dessous de 0,5 mg/l. Une teneur en oxygène aussi basse n'est acceptable que si la méthode utilisée pour mesurer l'oxygène dissous est capable de mesurer de telles concentrations avec précision.

Voir également I.5.2.

VI.3.3. Rapport

Voir 1.8.

VI.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI EN FIOLES FERMÉES

1. **LABORATOIRE**
2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**
3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: ... mg/l

Concentration initiale dans la fiole: ... mg/l

DThO/DCO: ... mg O₂/mg de produit à étudier

4. **INOCULUM**

Origine: ...

Traitement: ...

▼B

Préconditionnement éventuel: ...

Concentration dans le mélange réactionnel: ... mg/l

5. DÉTERMINATION DE L'OD

Méthode de Winkler ou de l'électrode.

Analyses des fioles

| Temps d'incubation (d) | | | OD (mg/l) | | | |
|------------------------|-----------------------------|----------------|-----------|----------------|----------------|--|
| | | | 0 | n ₁ | n ₂ | |
| Blanc (sans produit) | 1 | C ₁ | | | | |
| | 2 | C ₂ | | | | |
| Moyenne | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ | | | | | |
| Produit à étudier | 1 | a ₁ | | | | |
| | 2 | a ₂ | | | | |
| Moyenne | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | | |

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et le témoin de toxicité.

6. CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION (annexe V)

| Temps d'incubation (d) | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ |
|------------------------|--|---|----------------|----------------|----------------|
| (i) | Concentration de nitrate (mg N/l) | | | | |
| (ii) | Modif. de la conc. de nitrate (mg N/l) | — | | | |
| (iii) | Équivalent oxygène (mg/l) | — | | | |
| (iv) | Concentration de nitrite (mg N/l) | | | | |
| (v) | Modif. de la conc. de nitrite (mg N/l) | — | | | |
| (vi) | Équivalent oxygène (mg/l) | — | | | |
| (iii + vi) | Total équivalent oxygène (mg/l) | — | | | |

7. PERTE D'OD: % DE DÉGRADATION

| | Perte après n jours (mg/l) | | | |
|--|----------------------------|----------------|----------------|--|
| | n ₁ | n ₂ | n ₃ | |
| FIOLE 1: (m _{t0} — m _{tx}) — (m _{b0} — m _{bx}) | | | | |
| FIOLE 2: (m _{t0} — m _{tx}) — (m _{b0} — m _{bx}) | | | | |

▼B

| | Perte après n jours (mg/l) | | | |
|---|----------------------------|----------------|----------------|--|
| | n ₁ | n ₂ | n ₃ | |
| FIOLE 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times D_{ThO}}$ | | | | |
| FIOLE 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times D_{ThO}}$ | | | | |
| $\% D \text{ moyen (*)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$ | | | | |
| (*) Ne pas utiliser la moyenne si tes résultats des essais en double varient considérablement. | | | | |

m_{t_0} = valeur dans la fiole d'essai au temps 0

m_{t_x} = valeur dans la fiole d'essai au temps x

m_{b_0} = valeur moyenne du blanc au temps 0

m_{b_x} = valeur moyenne du blanc au temps x

Appliquer également la correction tenant compte de la nitrification mentionnée aux points (iii) et (vi) du paragraphe 6.

8. PERTE D'OD DANS L'ESSAI À BLANC

Consommation d'oxygène dans l'essai à blanc: ($m_{b_0} - m_{b_{28}}$) mg/l. Cette consommation est importante pour la validité de l'essai. Elle doit être inférieure à 1,5 mg/l.

PARTIE VII. ESSAI M.I.T.I. (Méthode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La consommation d'oxygène d'une solution ou d'une suspension agitée de substance à étudier dans un milieu minéral,ensemencée avec des micro-organismes cultivés à cet effet sans adaptation préalable, est établie à l'aide d'un respiromètre automatique en circuit fermé, à l'obscurité, pendant une période de 28 jours à 25 ± 1 °C. Le dioxyde de carbone dégagé est absorbé par de la chaux sodée. La biodégradabilité est exprimée par le pourcentage de la consommation d'oxygène (corrigé en fonction de la consommation dans l'essai à blanc) par rapport à la consommation théorique (DThO). Le pourcentage de biodégradabilité primaire est également calculé d'après les analyses chimiques spécifiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation et, éventuellement, à l'aide de l'analyse du COD.

VII.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

VII.2.1. Appareillage

a) appareil de mesure automatique de la DBO par électrolyse ou respiromètre normalement équipé de 6 fioles d'une contenance de 300 ml chacune et de récipients contenant l'absorbant de CO₂;

▼B

- b) pièce thermostatée et/ou bain-marie à 25 °C (± 1 °C au maximum);
- c) dispositif de filtration sur membrane (facultatif);
- d) analyseur de carbone (facultatif).

VII.2.2. Préparation du milieu minéral

Préparer les solutions mères suivantes, à l'aide de réactifs de qualité analytique et d'eau (1.6.1.):

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | Chlorure d'ammonium, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| | Le pH de la solution doit être égal à 7,2 | |
| b) | Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| c) | Chlorure de calcium, anhydre CaCl_2 | 27,50 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| d) | Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |

Prélever 3 ml de chacune des solutions a), b) c) et d) et compléter le volume à 1 litre.

VII.2.3. Préparation de l'inoculum

Recueillir des échantillons frais dans 10 emplacements au moins, principalement dans des zones où divers produits chimiques sont utilisés et rejetés dans l'environnement. Recueillir des échantillons d'un litre de boue, de sols superficiels, d'eau, etc., dans des sites tels que les stations d'épuration des eaux d'égout, les stations d'épuration industrielle, les rivières, les lacs et les mers et bien les mélanger. Après avoir enlevé les matières flottantes, laisser reposer le mélange, puis ajuster le pH du surnageant à 7 ± 1 au moyen d'hydroxyde de sodium ou d'acide phosphorique.

Utiliser un volume de surnageant filtré suffisant pour remplir un récipient de traitement des boues activées et aérer le liquide pendant environ 23 heures 30. Trente minutes après avoir interrompu l'aération, retirer environ un tiers du volume total du liquide surnageant et ajouter à la partie décantée un volume égal d'une solution (pH 7) contenant 0,1 % de chacun des produits suivants: glucose, peptone, monophosphate de potassium, puis aérer à nouveau le mélange. Répéter cette opération chaque jour. La réserve de boue doit être préparée selon les bonnes pratiques: l'effluent doit être clair, la température doit être maintenue à 25 ± 2 °C, son pH égal à 7 ± 1 , la boue doit bien décanter, l'aération doit être suffisante pour que le mélange soit en permanence en aérobiose, des protozoaires doivent être présents et l'activité de la boue doit être testée à l'aide d'une substance de référence au moins tous les trois mois. Ne pas utiliser la boue comme inoculum avant au moins un mois après sa préparation ni après plus de quatre mois. Il convient donc d'effectuer périodiquement des prélèvements d'échantillons, tous les trois mois, en 10 emplacements différents au moins.

▼B

Afin de conserver la même activité aux boues fraîches et anciennes, le surnageant filtré d'une boue activée utilisée pour l'essai doit être mélangé en volume égal au surnageant filtré d'une boue fraîchement recueillie provenant de dix sources différentes. Le mélange ainsi obtenu est mis en culture comme décrit ci-avant. Prélever la boue pour l'utiliser comme inoculum 18 à 24 heures après cette opération.

VII.2.4. Préparation des fioles

Préparer les six fioles suivantes:

N° 1: eau de dilution contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N°s 2, 3 et 4: milieu minéral contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N° 5: milieu minéral contenant 100 mg/l de produit de référence (par exemple de l'aniline),

N° 6: milieu minéral seul.

Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'en ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les instructions figurant à l'annexe III, en n'utilisant toutefois ni solvant ni émulsifiant. Placer l'absorbant de CO₂ pour chaque fiole, dans la coupelle spécialement prévue à cet effet. Ajuster à 7,0 le pH de la solution contenue dans les fioles n°s 2, 3 et 4.

VII.2.5. Déroulement de l'essai

Ensemencer les fioles n°s 2, 3 et 4 (suspensions d'essai), n° 5 (témoin d'activité) et n° 6 (blanc contenant l'inoculum) avec un petit volume d'inoculum de manière à ce que la concentration des matières solides en suspension soit égale à 30 mg/l. Ne pas ajouter d'inoculum dans la fiole n° 1 qui sert de témoin abiotique. Assembler le matériel, vérifier l'étanchéité à l'air, brancher les agitateurs et commencer à mesurer la consommation d'oxygène dans l'obscurité. Vérifier chaque jour la température et le fonctionnement des agitateurs et de l'enregistreur de l'appareil de mesure coulométrique de la consommation d'oxygène et noter toute modification de couleur du milieu contenu dans les fioles. Lire la consommation d'oxygène dans les six fioles directement avec une méthode appropriée, par exemple sur l'enregistreur à six points, qui fournit une courbe de la DBO. À la fin de l'incubation, dont la durée normale est de 28 jours, mesurer le pH du contenu des fioles et déterminer la concentration résiduelle de la substance à étudier et de toute substance intermédiaire et dans le cas d'une substance hydrosoluble, la concentration de COD (annexe II.4). Des précautions particulières doivent être prises pour étudier les produits volatiles. Si un processus de nitrification est prévisible, déterminer, si possible, la concentration en nitrates et nitrites.

VII.3. PRÉSENTATION DES DONNÉES**VII.3.1. Traitement des résultats**

La quantité d'oxygène consommée (mg) par la substance d'essai après un temps donné, corrigée de façon à tenir compte de la quantité d'O₂ consommée dans l'essai à blanc contenant l'inoculum après la même période de temps, est divisée par le poids de substance à étudier utilisé pour l'essai. Le résultat ainsi obtenu correspond à la DBO exprimée en mg d'oxygène/mg de substance d'essai, c'est-à-dire:

$$DBO = \frac{\text{mg O}_2 \text{ consom. par la substance d'essai} - \text{mg O}_2 \text{ consom. par le blanc}}{\text{mg de substance d'essai dans la fiole}}$$

$$= \text{mg d'O}_2/\text{mg de substance d'essai}$$

▼B

Le pourcentage de biodégradation est alors obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de biodégradation} = \% \text{ DThO} = \frac{\text{DBO (mg O}_2\text{/mg produit)}}{\text{DThO (mg O}_2\text{/mg produit)}} \times 100$$

Pour les mélanges, calculer la DThO à partir de l'analyse élémentaire, comme pour un composé simple. Choisir la DThO appropriée (DThO_{NH4} ou DThO_{NO3}) selon que la nitrification est absente ou complète (annexe II.2). Cependant, si la nitrification se produit mais sans toutefois être complète, il convient d'effectuer une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par la nitrification à partir des modifications de la concentration en nitrites et en nitrates (annexe V).

Calculer le pourcentage de biodégradation primaire à partir de la perte de produit chimique spécifique (d'origine) (voir 1.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de produit d'essai dans la fiole n° 1, il convient de le consigner et de calculer le pourcentage de biodégradation en utilisant la concentration de substance d'essai (S_b) dans la fiole au bout de 28 jours.

Si la concentration de COD est déterminée (facultatif), calculer le pourcentage de biodégradation ultime à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

décrite au paragraphe I.7.1. Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de COD dans la fiole n° 1, il convient de calculer le pourcentage de dégradation en utilisant la concentration de COD dans cette fiole.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

VII.3.2. Validité des résultats

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg O₂/l et ne doit pas excéder 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se trouve en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par la substance d'essai est inférieure à 60 %, l'essai doit être répété avec une concentration plus faible de substance à étudier.

Voir également I.5.2.

Si le pourcentage de dégradation de l'aniline calculé à partir de la consommation d'oxygène ne dépasse pas 40 % après 7 jours et 65 % après 14 jours, l'essai est considéré comme non valable.

VII. 3.3. Rapport

Voir I.8.

VII.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI MITI (I)

1. LABORATOIRE
2. DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI

▼B**3. SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: ... mg/l de produit

Conc. initiale dans le milieu, C_0 : ... mg/l de produit

Volume du mélange réactionnel, V: ... ml

DThO: ... mg O₂/l**4. INOCULUM**

Emplacements d'échantillonnage des boues:

- | | |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ... |
| 2) ... | 7) ... |
| 3) ... | 8) ... |
| 4) ... | 9) ... |
| 5) ... | 10) ... |

Concentration des matières en suspension dans la boue activée après acclimatation à l'aide d'une eau d'égout synthétique = mg/l

Volume de boue activée par litre de milieu final = ml

Concentration de boue dans le milieu final = mg/l

5. CONSOMMATION D'OXYGÈNE: BIODÉGRADABILITÉ

Type de respiromètre utilisé:

| | | Temps (jours) | | | | |
|--|-------------------------|---------------|---|----|----|----|
| | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Cons. d'O ₂ (mg) du produit | a ₁ | | | | | |
| | a ₂ | | | | | |
| | a ₃ | | | | | |
| Cons. d'O ₂ (mg) du blanc | b | | | | | |
| Cons. d'O ₂ corrigée (mg) | (a ₁ - b) | | | | | |
| | (a ₂ - b) | | | | | |
| | (a ₃ - b) | | | | | |
| DBO par mg de produit | $\frac{(a - b)}{C_0 V}$ | Fiole 1 | | | | |
| | | Fiole 2 | | | | |
| | | Fiole 3 | | | | |
| % dégradation $\frac{DBO}{DThO} \times 100$ | | 1 | | | | |
| | | 2 | | | | |
| | | 3 | | | | |
| | | moy (*) | | | | |

(*) Ne pas calculer la moyenne lorsque la différence entre les répliqués est trop grande.

▼B

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. ANALYSE DE CARBONE (facultative)

Analyseur de carbone: ...

| Fiole | COD | | | | % COD éliminé | Moy. |
|-----------------------|----------------|--|--------------------|--|---------------|------|
| | Mesuré | | Corrigé | | | |
| Eau + subst. d'essai | a | | | | — | — |
| Boue + subst. d'essai | b ₁ | | b ₁ — c | | | |
| Boue + subst. d'essai | b ₂ | | b ₂ — c | | | |
| Boue + subst. d'essai | b ₃ | | b ₃ — c | | | |
| Essai à blanc | c | | — | | — | — |

$$\% \text{ COD éliminé: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. DONNÉES DE L'ANALYSE SPÉCIFIQUE CHIMIQUE

| | Quantité résiduelle de produit à la fin de l'essai | % de dégradation |
|-----------------------------|--|------------------|
| essai à blanc avec de l'eau | S _b | |
| milieu inoculé | S _{a1} | |
| | S _{a2} | |
| | S _{a3} | |

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calculer le % de dégradation pour les fioles a₁ a₂ et a₃ respectivement.

8. OBSERVATIONS

La courbe de la DBO en fonction du temps doit, le cas échéant, être jointe.

▼B*Annexe I***ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS**

- OD: oxygène dissous (mg/l), c'est-à-dire la concentration d'oxygène dissous dans un échantillon aqueux.
- DBO: demande biochimique en oxygène (g), soit la quantité d'oxygène consommée par des micro-organismes au moment où ils métabolisent un produit soumis à l'essai; la DBO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de produit à étudier (voir la méthode C.5).
- DCO: demande chimique d'oxygène (g), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée au cours de l'oxydation d'un produit à étudier en présence de bichromate acide chaud; la DCO fournit une mesure de la quantité de matière oxydable présente; la DCO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de substance à étudier (voir méthode C.6).
- COD: carbone organique dissous. Il s'agit du carbone organique présent dans une solution ou qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 min à 40 000 m.s.⁻² (± 4 000 g).
- DThO: demande théorique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité totale d'oxygène nécessaire pour parvenir à l'oxydation complète d'un produit chimique. Elle est calculée à partir de la formule moléculaire (voir annexe II.2). La DThO est également exprimée en mg d'oxygène nécessaire par mg de produit à étudier.
- CO₂Th: dioxyde de carbone théorique (mg). Il s'agit de la quantité calculée de dioxyde de carbone pouvant être produite à partir du contenu en carbone mesuré ou connu dans le produit à étudier, lors de sa minéralisation totale. Le CO₂Th est également exprimé en mg de dioxyde de carbone qui se dégage par mg de produit à étudier.
- COT: carbone organique total. Le COT d'un échantillon est égal à la somme du carbone organique en solution et en suspension.
- CI: carbone inorganique.
- CT: carbone total. Le CT est égal à la somme du carbone organique et du carbone inorganique présents dans l'échantillon.

Biodégradation primaire:

Altération de la structure chimique d'une substance obtenue par une action biologique et entraînant la perte de propriétés spécifiques de cette substance.

Biodégradation ultime (en aérobiose):

Taux de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance à étudier a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse).

Facilement biodégradable:

Il s'agit d'un classement arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à des essais portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on suppose que ces composés se dégradent rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions d'aérobiose.

▼B*Intrinsèquement biodégradable:*

Il s'agit d'une classification des produits chimiques donc la biodégradation (primaire ou ultime) a été prouvée sans ambiguïté au cours d'un essai de biodégradabilité reconnu internationalement.

Traitabilité:

Aptitude des composés à disparaître au cours du traitement biologique des eaux résiduaires sans effet indésirable sur le déroulement normal du traitement. D'une manière générale, les composés facilement biodégradables sont traitables, ce qui n'est pas le cas de tous les composés intrinsèquement biodégradables. Des processus abiotiques peuvent également se produire.

Phase de latence

correspond à la période qui, au cours d'un essai de disparition, sépare le moment de l'ensemencement de celui où le pourcentage de dégradation a augmenté d'au moins 10 %. La durée de la phase de latence est souvent extrêmement variable et peu reproductible.

Phase de dégradation

correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où 90 % du taux maximal de dégradation a été atteint.

Intervalle de 10 jours

Il s'agit des 10 jours immédiatement consécutifs au moment où le taux de dégradation atteint 10 %.



Annexe II

CALCUL ET DÉTERMINATION DE PARAMÈTRES APPROPRIÉS

Certains paramètres seront requis en fonction de la méthode choisie. Le chapitre suivant décrit le calcul de ces valeurs. L'utilisation de ces paramètres est décrite dans les chapitres consacrés à chaque méthode.

1. Teneur en carbone

La teneur en carbone est calculée à partir de la composition élémentaire connue de la substance à étudier, ou déterminée par l'analyse élémentaire de cette substance.

2. Demande théorique en oxygène (DThO)

La demande théorique en oxygène (DThO) peut être calculée si la composition élémentaire est connue ou déterminée par analyse élémentaire. Par exemple la DThO du composé suivant:



sera, en l'absence de nitrification, égale à:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16 [2 c + 1/2 (h - cl - 3 n) + 3 s + 5/2 p + 1/2 na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

et si une nitrification a lieu, elle sera égale à:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 [2 c + 1/2 (h - cl) + 5/2 n + 3 s + 5/2 p + 1/2 na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée à l'aide de la méthode C.6.

4. Carbone organique dissous (COD)

Le carbone organique dissous (COD) est, par définition, le carbone organique présent dans la solution aqueuse d'un produit chimique ou d'un mélange, qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre.

Prélever des échantillons dans les récipients d'essai et les filtrer immédiatement à l'aide d'un dispositif de filtration en utilisant une membrane filtrante appropriée. Les 20 premiers ml de filtrat (la quantité peut être réduite si on utilise des filtres de petite taille) sont éliminés. Un volume de filtrat compris entre 10 et 20 ml, ou moins s'il doit être injecté (le volume dépend de la quantité requise pour l'analyseur de carbone), est retenu afin d'en analyser la teneur en carbone. La concentration en COD est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone organique capable de mesurer avec précision une concentration de carbone égale ou inférieure à 10 % de la concentration initiale de COD utilisée pour l'essai.

Les échantillons filtrés qui ne sont pas analysés le jour même peuvent être conservés pendant 48 heures dans un réfrigérateur entre 2 et 4 °C ou en-dessous de — 18 °C pour des périodes plus longues.

Remarque:

Les membranes filtrantes étant souvent imprégnées d'agents tensio-actifs pour l'hydrophilisation, sont susceptibles de contenir plusieurs milligrammes de carbone organique soluble qui interfèrent avec les déterminations de la biodégradabilité. Pour débarrasser les filtres des agents tensio-actifs ainsi que d'autres composés organiques solubles, il convient de les faire bouillir trois fois pendant une heure dans de l'eau déionisée. Ils peuvent ensuite être conservés dans de l'eau pendant une semaine. Si l'on utilise des cartouches filtrantes à usage unique, chaque lot doit être vérifié afin de s'assurer qu'il ne libère pas de carbone organique soluble.

▼B

La substance à étudier peut être retenue par adsorption sur certains types de membranes filtrantes. C'est pourquoi il est conseillé de s'assurer que le produit à étudier n'est pas retenu par le filtre.

Une centrifugation à 40 000 m.sec⁻² (4 000 g) pendant 15 minutes peut remplacer la filtration pour distinguer le COT du COD. Cette méthode n'est pas fiable si la concentration initiale en COD est inférieure à 10 mg/l, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas éliminées, soit parce que du carbone faisant partie intégrante du plasma bactérien est redissous.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.
- (2) Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.
- (3) DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- (4) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

*Annexe III***ÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES SUBSTANCES FAIBLEMENT SOLUBLES**

Lors des essais de biodégradabilité concernant des substances faiblement solubles, il faut prêter une attention particulière aux éléments énoncés ci-après.

Alors que les liquides homogènes posent rarement des problèmes d'échantillonnage, il est recommandé d'homogénéiser les matières solides par des moyens appropriés afin d'éviter les erreurs dues au manque d'homogénéité. Il convient de prendre des précautions particulières pour prélever, dans des mélanges de produits chimiques ou dans des substances riches en impuretés, des échantillons de quelques milligrammes qui soient représentatifs.

Différents types d'agitation peuvent être utilisés au cours de l'essai, mais il faut veiller à ce que l'agitation soit juste suffisante pour maintenir la dispersion du produit tout en évitant une surchauffe, la formation excessive de mousse ou des forces de cisaillement excessives.

Il est possible d'utiliser un émulsifiant qui produise une dispersion stable du produit. Il ne devra ni être toxique pour les bactéries, ni être biodégradé, ni former de la mousse dans les conditions d'essai.

Les mêmes critères s'appliquent aux solvants et aux émulsifiants.

Il n'est pas conseillé d'utiliser des supports solides pour les produits solides; leur utilisation peut, par contre, être appropriée dans le cas des substances huileuses.

Lorsqu'une substance auxiliaire, telle qu'un émulsifiant, un solvant ou un support, est utilisée, il convient d'effectuer un essai à blanc avec cette substance.

Les trois essais de respirométrie, CO₂, DBO ou MITI, conviennent pour étudier la biodégradabilité des composés faiblement solubles.

BIBLIOGRAPHIE

- de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. *Chemosphere*, 1987, Vol. 16, 833.
- Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, Vol. 13, 169.

▼B*Annexe IV***ÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES SUSPECTÉS DE TOXICITÉ VIS-À-VIS DE L'INOCULUM**

Lorsqu'un produit est soumis à des essais de biodégradabilité facile et semble ne pas être biodégradable, il est recommandé de suivre la procédure suivante si l'on souhaite effectuer une distinction entre inhibition et inertie (Reynolds et al., 1987).

Il convient de procéder aux essais de toxicité et de biodégradation avec des inoculums semblables ou identiques.

Pour évaluer la toxicité des produits soumis aux essais de biodégradabilité facile, il semble approprié d'appliquer soit l'une des méthodes suivantes soit une combinaison de ces méthodes: inhibition du taux de respiration de la boue (essai d'inhibition de la respiration des boues activées — directive 88/302/CEE), DBO, et/ou inhibition de la croissance.

S'il convient d'éviter l'inhibition due à la toxicité, il est suggéré d'utiliser pour les essais de biodégradabilité facile des concentrations de la substance d'essai inférieures au 1/10 de la valeur de la CE_{50} obtenue lors des essais de toxicité (ou inférieures à la valeur de la CE_{20}). Il est peu vraisemblable que les composés dont la CE_{50} a une valeur supérieure à 300 mg/l produisent un effet toxique lors des tests de biodégradabilité facile. Il est vraisemblable que des valeurs de CE_{50} inférieures à 20 mg/l poseront de sérieux problèmes lors des essais ultérieurs. Il convient dans ce cas d'employer de faibles concentrations d'essai nécessitant l'utilisation de l'essai en fioles fermées, qui est rigoureux et sensible, ou de produit marqué au ^{14}C . Une autre manière de procéder consiste à utiliser un inoculum acclimaté permettant d'utiliser des concentrations plus élevées de substance d'essai. Toutefois, dans ce cas, on perd le critère spécifique de l'essai de biodégradation facile.

BIBLIOGRAPHIE

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16,2259.

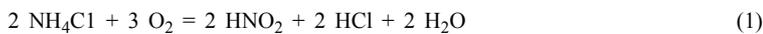


Annexe V

**CORRECTION TENANT COMPTE DE LA CONSOMMATION
D'OXYGÈNE DUE À L'INTERFÉRENCE DE LA NITRIFICATION**

Les erreurs commises en ne tenant pas compte de la nitrification lors de la détermination de la biodégradabilité par mesure de la consommation d'oxygène sont mineures (inférieures à 5 %) lorsque les substances à étudier ne contiennent pas d'azote, même si l'oxydation de l'azote ammoniacal dans le milieu se produit occasionnellement dans les récipients d'essai ainsi que dans les essais à blanc. Par contre, des erreurs importantes peuvent se produire avec les substances qui contiennent de l'azote.

Si la nitrification se produit, mais n'est pas complète, la consommation d'oxygène observée dans le mélange réactionnel peut être corrigée d'une valeur correspondant à la quantité d'oxygène utilisée pour oxyder l'ammonium en nitrite et en nitrate, si les modifications de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de l'incubation sont déterminées par les équations suivantes:



Au total:



D'après l'équation (1), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote contenus dans du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour former des nitrites est égale à 96 g, ce qui correspond à un facteur 3,43 (96/28). De même, d'après l'équation (3), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote pour former des nitrates est de 128 g, ce qui correspond à un facteur 4,57 (128/28).

Les réactions étant séquentielles et effectuées par différentes espèces bactériennes distinctes, la concentration en nitrite peut augmenter ou diminuer; dans ce dernier cas, la concentration de nitrate est équivalente. La quantité d'oxygène consommée par la formation de nitrate est donc égale à 4,57 multiplié par l'augmentation de la concentration de nitrate, alors que la quantité d'oxygène associée à la formation de nitrite est égale à 3,43 multiplié par l'augmentation de la concentration en nitrite ou dans le cas d'une réduction de sa teneur, la perte en oxygène est égale à - 3,43 multiplié par la diminution de concentration.

Ainsi:

$$\text{O}_2 \text{ consommé par la formation de nitrate} = 4,57 \times \text{augmentation de la concentration de N-nitrate} \quad (4)$$

$$\text{O}_2 \text{ consommé par la formation de nitrite} = 3,43 \times \text{augmentation de la concentration de N-nitrite} \quad (5)$$

et donc

$$\text{O}_2 \text{ perdu lors de la disparition de nitrite} = - 3,43 \times \text{réduction de la concentration de N-nitrite} \quad (6)$$

De telle sorte que:

$$\text{la consommation d'O}_2 \text{ due à la nitrification} = \pm 3,43 \times \text{modif. de la conc. de N-nitrite} + 4,57 \times \text{augm. de la conc. de N-nitrate} \quad (7)$$

et donc:

$$\text{la consommation d'O}_2 \text{ due à l'oxydation du C} = \text{consommation totale observée} - \text{consommation due à la nitrification} \quad (8)$$

Une autre possibilité consiste à estimer que, si seul l'azote oxydé total est déterminé, la consommation d'oxygène due à la nitrification sera, en première approximation, égale à $4,57 \times$ l'augmentation de la teneur en azote oxydé.

La valeur corrigée de la consommation d'oxygène due à l'oxydation du C est ensuite comparée à la $D\text{ThO}_{\text{NH}_3}$ calculée selon les instructions figurant à l'annexe II.

▼B**C.5. DÉGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

La méthode a pour objet la mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO) de substances organiques, liquides ou solides.

Les données fournies par cet essai concernent les composés hydro-solubles; toutefois, les composés volatils et les composés à faible hydrosolubilité peuvent également être étudiés, du moins en principe.

La méthode est applicable uniquement aux substances organiques, non inhibitrices vis-à-vis des bactéries à la concentration utilisée au cours de l'essai. Si la substance d'essai n'est pas soluble à la concentration d'essai, des procédures particulières telles que le recours à la dispersion ultrasonique pourraient être utilisées, afin d'obtenir une bonne dispersion de la substance.

Des données sur la toxicité de la substance chimique peuvent être utiles pour l'interprétation de résultats faibles et pour le choix de concentrations d'essai appropriées.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉS

La DBO est définie comme la masse d'oxygène dissoute nécessaire pour assurer, dans des conditions définies, l'oxydation biochimique d'un volume défini d'une solution de la substance soumise aux essais.

Les résultats sont exprimés en grammes de DBO par gramme de substance soumise à l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il est souhaitable de vérifier l'activité de l'inoculum à l'aide d'une substance de référence appropriée.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Ensemencer avec des micro-organismes et incubé à une température ambiante constante, définie, dans l'obscurité, une quantité prédéterminée de substance, dissoute ou dispersée en milieu aéré approprié.

La DBO est déterminée par la différence entre la teneur en oxygène dissous au début et à la fin de l'essai. La durée de l'essai est d'au moins cinq jours et ne dépassera pas 28 jours.

Un blanc doit être déterminé dans un essai parallèle ne contenant pas de substance d'essai.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La détermination de la DBO ne peut être considérée comme représentant valablement la biodégradabilité d'une substance et ne constitue qu'un essai de sélection.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance, afin d'obtenir une concentration de DBO compatible avec la méthode utilisée. La DBO est alors déterminée par application de toute méthode appropriée, normalisée, nationale ou internationale.

▼B**2. ÉVALUATION DES DONNÉES**

La DBO contenue dans la solution préliminaire est calculée suivant la méthode normalisée choisie et convertie en grammes de DBO par gramme de substance d'essai.

3. RÉSULTATS

La méthode utilisée doit être indiquée.

La demande biochimique en oxygène doit être la moyenne d'au moins trois mesures valables.

Toutes les données et observations pertinentes aidant à l'interprétation des résultats doivent être consignées, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique, les effets toxiques et la composition intrinsèque de la substance susceptibles d'affecter les résultats.

L'utilisation de tout additif inhibiteur de la nitrification biologique doit être consignée.

4. RÉFÉRENCES

Exemples de méthodes normalisées:

NF T 90-103: Détermination de la demande biochimique en oxygène.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van net biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B**C.6. DÉGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

La méthode a pour objet la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) de substances organiques, liquides ou solides, par application de tout mode opératoire normalisé, dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le fait de disposer de données sur la formule de la substance facilitera la réalisation de cet essai ainsi que l'interprétation des résultats obtenus (par exemple, sels halogénés, sels ferreux de composés organiques, composés organochlorés).

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La demande chimique en oxygène est la mesure de l'oxydabilité d'une substance, définie comme la quantité d'oxygène d'un réactif oxydant, consommée par la substance dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le résultat est exprimé en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

L'emploi de substances de référence n'est pas requis dans tous les cas où l'on analyse une nouvelle substance. Ces substances de référence doivent permettre d'étalonner périodiquement la méthode et de permettre la comparaison des résultats en cas d'application de méthodes différentes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Une quantité déterminée de substance dissoute ou dispersée dans de l'eau est oxydée à l'aide de bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique concentré (le catalyseur étant du sulfate d'argent) à reflux pendant deux heures. Le bichromate résiduel est dosé par titration à l'aide de sulfate ferreux ammoniacal titré.

Au cas où les substances contiennent du chlore, ajouter du sulfate mercurique ⁽¹⁾ pour réduire l'interférence des chlorures.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

En raison des conditions arbitraires de détermination de la DCO, cette dernière est un «indicateur d'oxydabilité» à utiliser en tant que tel comme méthode pratique de mesure de matière organique.

Les chlorures peuvent interférer au cours de cet essai; des substances inorganiques réductrices ou oxydantes peuvent également interférer avec la détermination de la DCO.

Certains composés cycliques et un grand nombre de produits volatils (par exemple les acides gras inférieurs) ne sont pas totalement oxydés lors de l'essai.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance pour obtenir une DCO de 250 à 600 milligrammes par litre.

⁽¹⁾ Afin d'éviter la dissémination de mercure dans l'environnement, les solutions contenant des sels de mercure doivent être traitées après utilisation.

▼B*Remarque:*

Dans le cas des substances peu solubles et non dispersables, peser une quantité de substance finement pulvérisée ou à l'état liquide, correspondant à environ 5 milligrammes de DCO, et l'introduire dans l'appareil d'expérimentation avec addition d'eau.

Il est souvent avantageux, en particulier lorsqu'on a affaire à des substances peu solubles, de déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) à l'aide d'une variante de la méthode, c'est-à-dire dans un système clos muni d'un régulateur de pression (H. Kelkenberg, 1975). Cette modification permet souvent de parvenir à quantifier des substances qui le sont difficilement en utilisant la méthode classique — par exemple l'acide acétique. Toutefois cette méthode échoue elle aussi dans le cas de la pyridine. Le fait d'augmenter jusqu'à une valeur 0,25 N (0,0416 M) la concentration de bichromate de potassium prescrite dans la référence (1) facilite la pesée directe d'une quantité de substance comprise entre 5 et 10 mg, ce qui est essentiel pour déterminer la DCO de substances faiblement hydrosolubles [référence (2)].

Dans les autres cas, déterminer la DCO en suivant toute méthode normalisée nationale ou internationale.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Calculer la DCO contenue dans le flacon expérimental, suivant la méthode normalisée choisie, et convertir en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

3. RÉSULTATS

La méthode de référence utilisée doit être indiquée.

La demande chimique en oxygène sera la moyenne d'au moins trois mesures. Il sera fait état de toutes données et observations présentant de l'intérêt pour l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique et les propriétés spécifiques de la substance (si elles sont connues) susceptibles d'affecter les résultats.

Mentionner si l'on a fait usage de sulfate mercurique pour réduire l'interférence des chlorures.

4. RÉFÉRENCES

- (1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
- (2) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds, Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Exemples de méthodes normalisées:

NBN T 91-201 Détermination of the chemical oxygen demand.

ISBN O11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Détermination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Détermination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Détermination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B**C.7. DÉGRADATION — DÉGRADATION ABIOTIQUE: HYDROLYSE EN FONCTION DU PH****1. MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice 111 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les substances chimiques qui pénètrent dans les eaux de surface par différentes voies (applications directes, déperditions lors de l'épandage, drainages, élimination de déchets, effluents industriels, domestiques ou agricoles et dépôts atmosphériques) peuvent y être transformées sous l'action de processus chimiques (hydrolyse ou oxydation, par exemple), photochimiques et/ou microbiens. La ligne directrice 111 de l'OCDE décrit une méthode d'essai en laboratoire permettant d'évaluer les transformations hydrolytiques abiotiques des substances chimiques en milieux aquatiques à des valeurs de pH normalement rencontrées dans l'environnement (pH de 4 à 9), et s'appuie sur des lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Des expériences sont menées pour déterminer: (i) le taux d'hydrolyse de la substance d'essai en fonction du pH; et (ii) l'identité ou la nature et les taux de formation et de disparition des produits d'hydrolyse auxquels les organismes peuvent être exposés. De telles études peuvent être requises pour les substances chimiques qui sont appliquées directement dans l'eau ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement par les différentes voies décrites ci-dessus.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉS

Voir annexe 2.

1.3. APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE

Cette méthode est globalement applicable aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe une méthode analytique suffisamment sensible et précise. Elle convient également pour les composés légèrement volatils et non volatils suffisamment solubles dans l'eau. En revanche, cet essai ne peut pas être appliqué aux produits chimiques hautement volatils dans l'eau (fumigants et solvants organiques, par exemple), impossibles à maintenir en solution dans les conditions expérimentales de l'essai. De même, avec les substances trop peu solubles dans l'eau, la réalisation de cet essai peut s'avérer difficile (8).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des solutions aqueuses tampon stériles de différents pH (pH 4, 7 et 9) sont traitées avec la substance d'essai et incubées dans l'obscurité dans des conditions expérimentales contrôlées (à des températures constantes). Après des intervalles de temps appropriés, on analyse les solutions tampon pour déterminer la présence de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse. Avec une substance d'essai marquée (par exemple, au ¹⁴C), il est plus facile d'établir un bilan massique.

La présente méthode décrit une approche à plusieurs niveaux, dont le détail est donné dans l'annexe 1. Chaque niveau est déclenché par les résultats du niveau précédent.

▼B

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Des substances d'essai marquées ou non peuvent être utilisées pour mesurer le taux d'hydrolyse. Les matières marquées conviennent généralement mieux pour étudier le chemin réactionnel de l'hydrolyse et établir un bilan massique. Toutefois, dans certains cas particuliers, le marquage n'est pas impératif. Le marquage au ^{14}C est recommandé, mais l'utilisation d'autres isotopes (^{13}C , ^{15}N , ^3H , par exemple) peut aussi convenir. Autant que possible, le marquage doit être placé dans la partie la plus stable de la molécule. Par exemple, si la substance d'essai comporte un cycle, le marquage de celui-ci est requis. En revanche, pour les substances comportant deux cycles ou plus, il peut être nécessaire de procéder à des études distinctes pour évaluer le sort de chaque cycle marqué et obtenir les informations requises sur la formation des produits d'hydrolyse. La pureté de la substance d'essai doit être au moins de 95 %.

Avant de procéder à un essai d'hydrolyse, il convient de rassembler les informations suivantes sur la substance d'essai:

- a) solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6];
- b) solubilité dans les solvants organiques;
- c) pression de vapeur [Méthode d'essai A.4] et/ou constante de la loi de Henry;
- d) coefficient de partage n-octanol/eau [méthode d'essai A.8];
- e) constante de dissociation (pK_a) [ligne directrice 112 de l'OCDE] (9);
- f) vitesse de phototransformation directe et indirecte dans l'eau, le cas échéant.

Des méthodes d'analyse doivent être disponibles pour quantifier la substance d'essai et, le cas échéant, identifier et quantifier les produits d'hydrolyse dans les solutions aqueuses (voir également le point 1.7.2).

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Lorsque cela est possible, il convient d'utiliser des substances de référence pour identifier et quantifier les produits d'hydrolyse par analyse spectroscopique et chromatographique, ou autres méthodes suffisamment fines.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. Récupération

L'analyse d'au moins deux solutions tampon ou de leurs extraits, immédiatement après l'ajout de la substance d'essai donne une première indication de la répétabilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Ce sont les bilans massiques (dans le cas d'une matière marquée) qui permettent ensuite d'établir aux étapes suivantes la récupération des substances testées. La récupération des substances chimiques, marquées ou non, doit être comprise entre 90 et 110 % (7). S'il est techniquement difficile d'atteindre cette plage de valeurs, une récupération de 70 % des substances chimiques non marquées est acceptable, mais celle-ci doit faire l'objet d'une justification.

▼B**1.7.2. Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique**

Pour contrôler la répétabilité de la (ou des) méthode(s) analytique(s) utilisée(s) pour quantifier la substance d'essai et les produits d'hydrolyse, on peut procéder à deux analyses des mêmes solutions tampon (ou de leurs extraits) après que des produits d'hydrolyse ont été formés en quantités suffisantes pour permettre une quantification.

La méthode analytique doit être suffisamment sensible pour permettre de quantifier des concentrations de la substance d'essai jusqu'à 10 %, ou moins, de la concentration initiale. Le cas échéant, les méthodes analytiques doivent également permettre de quantifier tout produit d'hydrolyse représentant 10 % ou plus de la substance appliquée (à n'importe quel moment au cours de l'étude), et jusqu'à 25 % ou moins de sa concentration maximale.

1.7.3. Intervalles de confiance pour les données cinétiques de l'hydrolyse

Des intervalles de confiance doivent être calculés et présentés pour tous les coefficients de régression, constantes de vitesse, demi-vies et autres paramètres cinétiques (DT_{50} , par exemple).

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**1.8.1. Matériel et appareillage**

L'étude doit être conduite dans des récipients en verre (tubes à essai, petits flacons, par exemple), et le cas échéant dans l'obscurité et dans des conditions de stérilité, sauf s'il ressort d'une information préliminaire (telle que le coefficient de partage n-octanol/eau) que la substance d'essai est susceptible d'adhérer au verre. Dans ce cas, une autre matière (le Téflon, par exemple) doit être envisagée. Les méthodes suivantes permettent également de contourner le problème de l'adhérence au verre:

- détermination de la masse de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse fixés par adsorption au récipient d'essai,
- utilisation d'un bain à ultrasons,
- nettoyage de toute la verrerie à l'aide d'un solvant à chaque intervalle d'échantillonnage,
- utilisation de produits formulés,
- utilisation d'une quantité plus importante de cosolvant à ajouter à la substance d'essai. Dans ce dernier cas, il convient d'employer un cosolvant qui n'entraîne pas de réaction d'hydrolyse de la substance d'essai.

L'incubation des différentes solutions d'essai doit être effectuée avec des agitateurs mécaniques à bain thermorégulé ou des incubateurs à commande thermostatique.

Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:

- un pH-mètre,

▼B

- des instruments d'analyse [équipements de chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, par exemple], et notamment des systèmes de détection appropriés pour l'analyse des substances radiomarquées ou non, l'application de la méthode de dilution isotopique inverse,
- des instruments d'identification (spectrométrie de masse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance, résonance magnétique nucléaire, etc.),
- un compteur à scintillation liquide;
- des entonnoirs d'extraction liquide-liquide,
- des instruments pour la concentration de solutions et d'extraits (évaporateur rotatif, par exemple),
- des dispositifs de contrôle de la température (bain d'eau, par exemple).

Les réactifs chimiques sont notamment:

- des solvants organiques, de pureté analytique, tels que l'hexane, le dichlorométhane, etc.,
- du liquide de scintillation,
- des solutions tampon (voir détails point 1.8.3).

Toute la verrerie, l'eau de qualité «réactif» et les solutions tampon utilisées dans les essais d'hydrolyse doivent être stérilisées.

1.8.2. **Application de la substance d'essai**

La substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans les différentes solutions tampon (voir annexe 3). Le cas échéant, pour obtenir une dissolution adéquate, l'utilisation de petites quantités de solvants miscibles dans l'eau (acétonitrile, acétone, éthanol, par exemple) est autorisée pour assurer une application et une distribution correctes de la substance d'essai, mais la proportion ne doit normalement pas dépasser 1 % v/v. Si une concentration supérieure en solvants est envisagée (par exemple dans le cas de substances d'essai faiblement solubles), cela ne peut être autorisé que s'il est démontré que le solvant n'a aucune incidence sur l'hydrolyse de la substance d'essai.

Le recours à un produit formulé n'est pas recommandé, dans la mesure où on ne peut exclure que les ingrédients de la formulation interfèrent avec le processus d'hydrolyse. Toutefois, pour les substances d'essai faiblement solubles dans l'eau, ou celles qui adhèrent au verre (voir point 1.8.1), le recours à un produit formulé peut constituer une solution acceptable.

Une seule concentration de la substance d'essai doit être utilisée; elle ne doit pas dépasser 0,01 M ou la moitié de la concentration de saturation (voir annexe 1).

▼B**1.8.3. Solutions tampon**

L'essai d'hydrolyse doit être réalisé aux valeurs de pH suivantes: 4, 7 et 9. À cet effet, il convient de préparer des solutions tampon avec des produits chimiques de pureté analytique et de l'eau. L'annexe 3 présente quelques systèmes tampon utiles. Il faut noter que le système tampon utilisé peut influencer la vitesse d'hydrolyse. Lorsque c'est le cas, il faut utiliser un autre système tampon ⁽¹⁾.

Le pH de chaque solution tampon doit être vérifié avec un pH-mètre étalonné à la température désirée avec une précision d'au moins 0,1.

1.8.4. Conditions d'essai**1.8.4.1. Température d'essai**

Les expériences d'hydrolyse doivent être menées à des températures constantes. Pour permettre l'extrapolation, il est important de maintenir la température constante à $\pm 0,5$ °C.

Si on ne connaît pas le comportement de la substance d'essai à l'hydrolyse, il est nécessaire d'effectuer un essai préliminaire (niveau 1) à une température de 50 °C. Les essais cinétiques suivants doivent être menés à un minimum de trois températures différentes (y compris l'essai à 50 °C), à moins que l'essai préliminaire de niveau 1 n'ait mis en évidence la stabilité de la substance à l'hydrolyse. Une plage de températures allant de 10 à 70 °C est préconisée (avec de préférence au moins une température inférieure à 25 °C). Cette plage englobe la température utilisée dans le rapport d'essai (25 °C) et la plupart des températures rencontrées sur le terrain.

1.8.4.2. Lumière et oxygène

Tous les essais d'hydrolyse doivent être effectués à l'aide d'une méthode adéquate pour éviter les effets de photolyse. Toutes les mesures appropriées doivent être prises afin d'éviter l'oxygène (par exemple, par barbotage d'hélium, d'azote ou d'argon pendant 5 minutes avant la préparation de la solution).

1.8.4.3. Durée de l'essai

L'essai préliminaire doit être mené pendant 5 jours, tandis que les essais des niveaux supérieurs doivent être conduits jusqu'à 90 % de la substance d'essai, ou pendant 30 jours, au premier des deux termes échus.

1.8.5. Exécution de l'essai**1.8.5.1. Essai préliminaire (niveau 1)**

L'essai préliminaire doit être réalisé à $50 \pm 0,5$ °C et aux pH suivants: 4, 7 et 9. Si au bout de 5 jours, on observe un taux d'hydrolyse inférieur à 10 % ($t_{0,5 \text{ } 25 \text{ } ^\circ\text{C}} > 1$ an), la substance est considérée comme stable dans l'eau et il n'est normalement pas nécessaire d'effectuer d'autres essais. Si on sait que la substance est instable aux températures observées dans l'environnement ⁽²⁾, il n'est pas obligatoire de réaliser un essai préliminaire. La méthode analytique employée doit être suffisamment précise et sensible pour détecter une diminution de 10 % de la concentration initiale.

⁽¹⁾ Mabey et Mill recommandent l'utilisation de tampons borate ou acétate de préférence à des tampons phosphate (11).

⁽²⁾ Cette information peut provenir d'autres sources, notamment des résultats d'hydrolyse de composés de structure comparable fournis par la littérature ou par d'autres essais d'hydrolyse préliminaires ou semi-quantitatifs effectués sur la substance d'essai à une étape plus précoce de son développement.

▼B1.8.5.2. *Hydrolyse des substances instables (niveau 2)*

L'essai de niveau supérieur (avancé) doit être exécuté aux valeurs de pH auxquelles la substance d'essai est apparue instable selon la procédure définie pour l'essai préliminaire ci-avant. Les solutions tamponnées de la substance d'essai doivent alors être thermostatées aux températures choisies. Pour savoir si la réaction est du premier ordre, chaque solution doit être analysée à des intervalles de temps qui fournissent un minimum de six points espacés, se situant normalement entre 10 et 90 % d'hydrolyse de la substance étudiée. Des échantillons répétés (un minimum de deux échantillons identiques contenus dans des cuves de réaction distinctes) doivent être prélevés et leur contenu analysé à chacune des six échéances d'échantillonnage (pour un minimum de 12 points identiques). L'option consistant à utiliser un seul échantillon global d'où serait tirée chacune des aliquotes de la solution d'essai à chaque intervalle d'échantillonnage n'est pas considérée comme appropriée du fait qu'elle ne permet pas d'analyser la variabilité des données, et qu'elle peut poser des problèmes de contamination de la solution d'essai. Des essais de confirmation de la stérilité doivent être effectués à la fin de l'essai de niveau supérieur (c'est-à-dire à 90 % d'hydrolyse ou à 30 jours). Toutefois, si aucune dégradation (c'est-à-dire aucune transformation) n'est observée, les essais de stérilité ne sont pas nécessaires.

1.8.5.3. *Identification des produits d'hydrolyse (niveau 3)*

Tout produit d'hydrolyse majeur, et au minimum ceux représentant > 10 % de la dose appliquée, doit être identifié selon les méthodes analytiques appropriées.

1.8.5.4. *Essais facultatifs*

Des essais supplémentaires à des pH autres que 4, 7 et 9 peuvent être nécessaires pour les substances d'essai instables sur le plan hydrolytique. Par exemple, à des fins physiologiques, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer un essai dans des conditions plus acides (par exemple à un pH de 1,2) à une seule température pertinente du point de vue physiologique (37 °C).

2. RÉSULTATS

Les quantités de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse, le cas échéant, doivent être exprimées en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, lorsque cela est possible, en mg/l pour chaque intervalle d'échantillonnage, ainsi que pour chaque pH et température d'essai. En outre, lorsqu'une substance d'essai marquée a été utilisée, un bilan massique doit être fourni en pourcentage de la concentration initiale appliquée.

Une présentation graphique des logarithmes des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps doit être présentée. Tous les produits d'hydrolyse majeurs, et au minimum ceux représentant > 10 % de la dose appliquée, doivent être identifiés, et les logarithmes de leurs concentrations doivent être présentés de la même manière que pour la substance mère, de façon à mettre en évidence leurs vitesses de formation et de disparition.

▼B

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Des déterminations plus précises des demi-vies ou des valeurs de DT_{50} doivent être obtenues par application des calculs de modèles cinétiques appropriés. Les valeurs de demi-vie et/ou de DT_{50} (y compris les limites de confiance) doivent être précisées pour chaque pH et chaque température, avec une description du modèle utilisé, l'ordre de réaction cinétique et le coefficient de détermination (r^2). Le cas échéant, ces calculs doivent être appliqués aux produits d'hydrolyse.

Pour les études menées à différentes températures, les constantes de la vitesse d'hydrolyse de pseudo-premier ordre (k_{obs}) doivent être décrites comme une fonction de température. Le calcul doit être basé sur une séparation des k_{obs} en constantes de vitesse pour les catalyses acides, neutres et basiques (respectivement k_H , k_{neutre} , et k_{OH}) et sur l'équation d'Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutre} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutre,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

où A_i et B_i sont des constantes de régression et d'interception, respectivement, des lignes de meilleur ajustement générées à partir de la régression linéaire $\ln k_i$ sur la réciproque de la température absolue en Kelvin (T). En utilisant la relation d'Arrhenius pour les catalyses acides, neutres et basiques, il est possible de calculer les constantes de pseudo-premier ordre, et ainsi les demi-vies, pour d'autres températures pour lesquelles la détermination expérimentale directe d'une constante de vitesse ne peut être pratiquée (10).

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATIONS DES RÉSULTATS

La plupart des réactions d'hydrolyse affichent une vitesse de réaction apparente de premier ordre, et par conséquent les demi-vies sont indépendantes de la concentration (voir l'équation 4 dans l'annexe 2). Cette caractéristique permet généralement d'appliquer les résultats obtenus en laboratoire, déterminés entre 10^{-2} et 10^{-3} M, aux conditions dans l'environnement ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey et Mill (11) font état de plusieurs exemples de bonne concordance entre les taux d'hydrolyse mesurés dans l'eau pure et dans les eaux naturelles, pour un ensemble de substances chimiques, à condition que le pH et la température aient bien été mesurés.

3. **RAPPORTS**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom commun, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir point 1.5),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu).

▼B

- Solutions tampon:
- dates et modalités de préparation,
- tampons et eaux utilisés,
- molarité et pH des solutions tampon.

Conditions d'essai:

- dates de réalisation des études,
- quantité de substance d'essai appliquée,
- méthodes et solvants utilisés (types et quantité) pour l'application de la substance d'essai,
- volume des solutions tamponnées de substances d'essai incubées,
- description du système d'incubation utilisé,
- pH et température au cours de l'étude,
- temps de prélèvement,
- méthode(s) d'extraction,
- méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et de ses produits d'hydrolyse dans les solutions tampon,
- nombre d'essais identiques.

Résultats:

- répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,
- récupérations (les pourcentages pour une étude correcte sont données au point 1.7.1),
- résultats et moyennes des essais identiques, présentés sous forme de tableaux,
- bilan massique au cours et à la fin des études (en cas d'utilisation d'une substance marquée),
- résultats de l'essai préliminaire,
- discussion et interprétation des résultats,
- intégralité des données et figures originales.

Les informations suivantes sont obligatoires uniquement si une vitesse d'hydrolyse est déterminée:

- tracés des concentrations en fonction du temps pour les substances d'essai et, le cas échéant, pour les produits d'hydrolyse à chaque valeur de pH et température,
- tableaux des résultats de l'équation d'Arrhenius pour la température 20 °C/25 °C, avec pH, constante [h^{-1} ou jour^{-1}], demi-vie ou DT_{50} , températures [en °C] y compris les limites de confiance et les coefficients de corrélation (r^2) ou toute information comparable,
- chemin réactionnel d'hydrolyse proposé.

▼B

4.

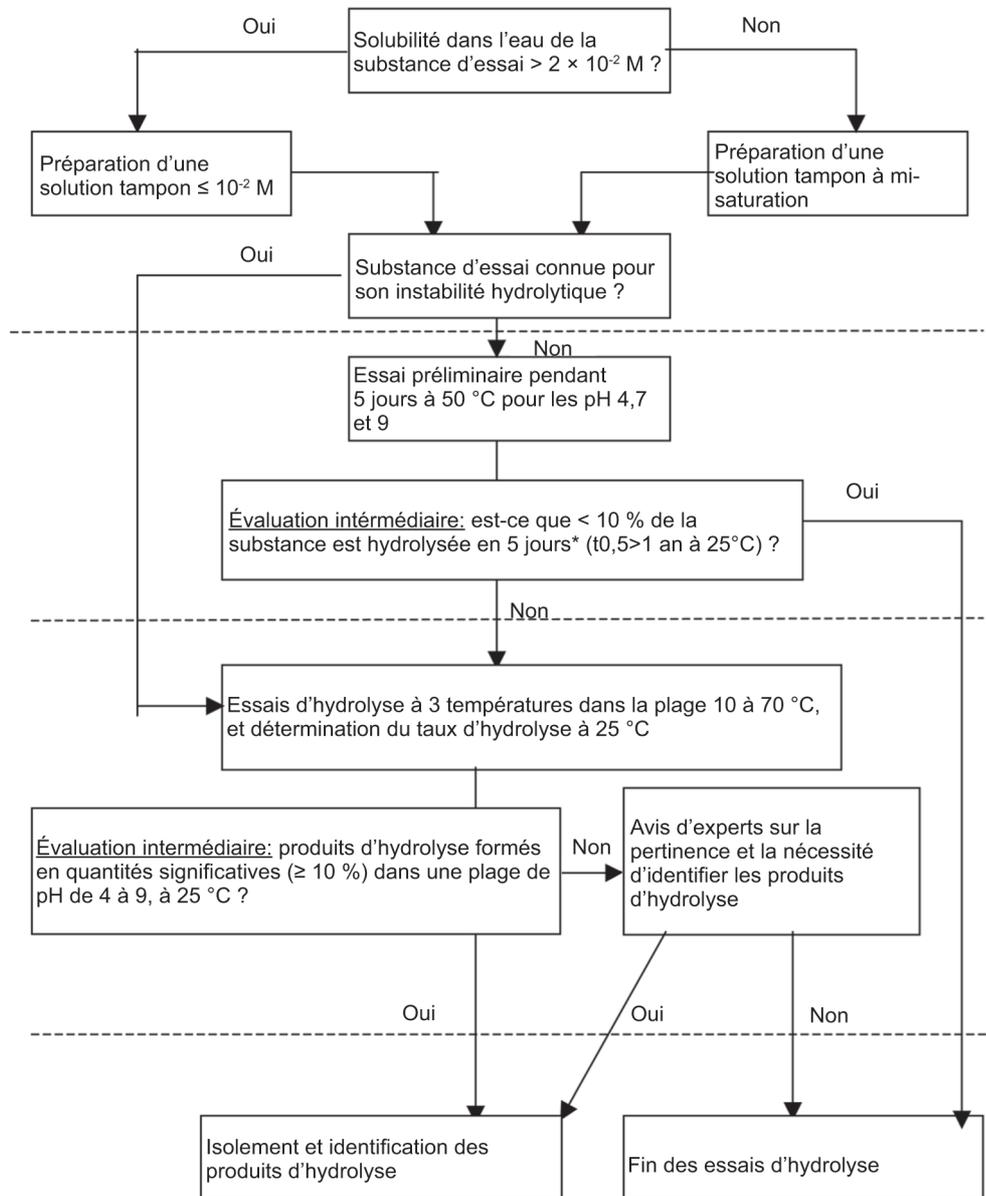
BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1981). Hydrolyse en fonction du pH. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, N° 111, adoptée le 12 mai 1981.
- (2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (3) Agriculture Canada (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada: chimie et devenir dans l'environnement.
- (4) Union européenne (UE) (1995), directive 2001/36/CE de la Commission du 16 mai 2001 portant modification de la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe V: Devenir et comportement dans l'environnement
- (5) Commission néerlandaise pour l'enregistrement des pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
- (7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.
- (9) OCDE (1993). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris. OCDE (1994-2000): 6e au 1 1e addenda aux Lignes directrices pour les essais de produits chimiques.
- (10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
- (11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Annexe I

Plan de l'essai d'hydrolyse par niveaux



* 10 % d'hydrolyse d'une substance d'essai à 50 °C correspond à une demi-vie de 30 jours approximativement, ce qui correspond à une valeur de 1 an à 25 °C approximativement

▼B*Annexe 2***Définitions et unités**

Les unités du système international d'unités (SI) doivent être utilisées.

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse du composé parent ou des produits de transformation.

Produits de transformation: toutes les substances résultant des réactions de transformation biotique ou abiotique de la substance d'essai.

Produits d'hydrolyse: toutes les substances résultant des réactions de transformation hydrolytique de la substance d'essai.

L'hydrolyse consiste en la réaction d'une substance d'essai RX avec l'eau, avec échange net du groupe X contre le groupe OH selon la réaction:



Dans ce processus simplifié, la vitesse à laquelle la concentration de RX décroît est donnée par:

$$\text{vitesse} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad \text{réaction du second ordre}$$

ou

$$\text{vitesse} = k [\text{RX}] \quad \text{réaction du premier ordre}$$

selon la phase qui détermine la vitesse. Du fait de la présence d'eau en large excès par rapport à la substance d'essai, ce type de réaction est habituellement décrit comme une réaction de premier ordre, dans laquelle la constante de vitesse observée est donnée par la relation:

$$k_{\text{obs}} = k[\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

et peut être déterminée à partir de l'expression (*)

$$k_{\text{obs}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

où

t = temps

et C_0 , C_t = concentrations de RX au temps 0 et au temps t.

Les unités de cette constante ont les dimensions de (temps)⁻¹ et la demi-vie de la réaction (temps au bout duquel 50 % de RX ont réagi) est donnée par:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

La demi-vie ($t_{0,5}$) est le temps requis pour obtenir 50 % d'hydrolyse d'une substance d'essai lorsque la réaction peut être décrite comme une cinétique du premier ordre. La demi-vie est indépendante de la concentration.

(*) Si le tracé des transformations logarithmiques en fonction du temps n'indique pas une fonction linéaire (ce qui équivaut à une vitesse de réaction du premier ordre), alors l'utilisation de l'équation [3] ne convient pas pour déterminer la constante de vitesse d'hydrolyse de la substance d'essai.

▼B

La **DT50 (Disappearance time 50)** correspond au laps de temps au bout duquel la concentration de la substance d'essai est réduite de 50 pour cent. Cette valeur est différente de la demi-vie ($t_{0,5}$) lorsque la réaction ne suit pas une cinétique du premier ordre.

Estimation de k à différentes températures

Lorsque les constantes de vitesse sont connues pour deux températures, les constantes de vitesse à d'autres températures peuvent être calculées en utilisant l'équation d'Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ or } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Un tracé de $\ln k$ en fonction de $1/T$ donne une ligne droite de pente $-E/R$

où:

k = constante de vitesse, mesurée à différentes températures

E = énergie d'activation [kJ/mol]

T = température absolue [K]

R = constante des gaz [8,314 J/mol*K]

L'énergie d'activation est calculée par analyse de régression ou par l'équation suivante:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

où: $T_2 > T_1$.

▼B

Annexe 3

Systèmes tampon

A. CLARK ET LUBS:

Mélanges tampons de CLARK et LUBS (*)

| Composition | pH |
|---|-----|
| HCl 0,2 N et KCl 0,2 N à 20 °C | |
| 47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml | 1,0 |
| 32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml | 1,2 |
| 20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. to 100 ml | 1,4 |
| 13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml | 1,6 |
| 8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml | 1,8 |
| 5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml | 2,0 |
| 3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml | 2,2 |
| Biphtalate de potassium 0,1 M + HCl 0,1 N à 20 °C | |
| 46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 2,2 |
| 39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 2,4 |
| 32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 2,6 |
| 26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 2,8 |
| 20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 3,0 |
| 14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 3,2 |
| 9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 3,4 |
| 5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 3,6 |
| 2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 3,8 |
| Biphtalate de potassium 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C | |
| 0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 4,0 |
| 3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 4,2 |
| 7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 4,4 |
| 12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 4,6 |
| 17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 4,8 |

(*) Ajouter de petits cristaux de thymol ou d'une substance comparable pour éviter la croissance de moisissures.

▼B

| Composition | pH |
|---|-----|
| 23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 5,0 |
| 29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 5,2 |
| 35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 5,4 |
| 39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 5,6 |
| 43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 5,8 |
| 45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml | 6,0 |

Phosphate monopotassique 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C

| | |
|--|-----|
| 5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 6,0 |
| 8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 6,2 |
| 12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 6,4 |
| 17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 6,6 |
| 23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 6,8 |
| 29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 7,0 |
| 35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 7,2 |
| 39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 7,4 |
| 42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 7,6 |
| 45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 7,8 |
| 46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml | 8,0 |

H3B03 0,1 M dans KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C

| | |
|--|-----|
| 2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 7,8 |
| 3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 8,0 |
| 5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 8,2 |
| 8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 8,4 |
| 12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 8,6 |
| 16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 8,8 |
| 21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 9,0 |
| 26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 9,2 |

▼B

| | |
|--|------|
| 32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 9,4 |
| 36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 9,6 |
| 40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 9,8 |
| 43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml | 10,0 |

B. KOLTHOFF ET VLEESCHHOUWER:**Tampons citrate de KOLTHOFF et VLEESCHHOUWER**

| Composition | pH |
|---|-----|
| Citrate monopotassique 0,1 M et HCl 0,1 N à 18 °C (*) | |
| 49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 2,2 |
| 43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 2,4 |
| 36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 2,6 |
| 30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 2,8 |
| 23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 3,0 |
| 17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 3,2 |
| 10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 3,4 |
| 4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 3,6 |
| Citrate monopotassique 0,1 M et NaOH 0,1 N à 18 °C (*) | |
| 2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 3,8 |
| 9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 4,0 |
| 16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 4,2 |
| 23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 4,4 |
| 31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 4,6 |
| 39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 4,8 |
| 46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 5,0 |
| 54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 5,2 |
| 61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 5,4 |
| 68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 5,6 |
| 74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 5,8 |
| 81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml | 6,0 |

(*) Ajouter de petits cristaux de thymol ou d'une substance comparable pour éviter la croissance de moisissures.

▼B

C. SÖRENSEN:

Mélanges de borate de SÖRENSEN

| Composition | | Sörensen 18 °C | Walbum, pH à | | |
|----------------------------------|-------------|-------------------|--------------|-------|-------|
| ml Borax | ml HCl/NaOH | | 10 °C | 40 °C | 70 °C |
| Borax 0,05 M + HCl 0,1 N | | | | | |
| | 4,75 | 7,62 | 7,64 | 7,55 | 7,47 |
| | 4,50 | 7,94 | 7,98 | 7,86 | 7,76 |
| | 4,25 | 8,14 | 8,17 | 8,06 | 7,95 |
| | 4,00 | 8,29 | 8,32 | 8,19 | 8,08 |
| | 3,50 | 8,51 | 8,54 | 8,40 | 8,28 |
| | 3,00 | 8,08 | 8,72 | 8,56 | 8,40 |
| | 2,50 | 8,80 | 8,84 | 8,67 | 8,50 |
| | 2,00 | 8,91 | 8,96 | 8,77 | 8,59 |
| | 1,50 | 9,01 | 9,06 | 8,86 | 8,67 |
| | 1,00 | 9,09 | 9,14 | 8,94 | 8,74 |
| | 0,50 | 9,17 | 9,22 | 9,01 | 8,80 |
| | 0,00 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| Borax 0,05 M + NaOH 0,1 N | | | | | |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| | 1,0 | 9,36 | 9,42 | 9,18 | 8,94 |
| | 2,0 | 9,50 | 9,57 | 9,30 | 9,02 |
| | 3,0 | 9,68 | 9,76 | 9,44 | 9,12 |
| | 4,0 | 9,97 | 10,06 | 9,67 | 9,28 |

Mélanges de phosphates de SÖRENSEN

| Composition | pH |
|--|-----|
| Phosphate monopotassique 0,0667 M + phosphate disodique 0,0667 M à 20 °C | |
| 99,2 ml KH ₂ PO ₄ + 0,8 ml Na ₂ HPO ₄ | 5,0 |
| 98,4 ml KH ₂ PO ₄ + 1,6 ml Na ₂ HPO ₄ | 5,2 |
| 97,3 ml KH ₂ PO ₄ + 2,7 ml Na ₂ HPO ₄ | 5,4 |
| 95,5 ml KH ₂ PO ₄ + 4,5 ml Na ₂ HPO ₄ | 5,6 |
| 92,8 ml KH ₂ PO ₄ + 7,2 ml Na ₂ HPO ₄ | 5,8 |
| 88,9 ml KH ₂ PO ₄ + 11,1 ml Na ₂ HPO ₄ | 6,0 |
| 83,0 ml KH ₂ PO ₄ + 17,0 ml Na ₂ HPO ₄ | 6,2 |
| 75,4 ml KH ₂ PO ₄ + 24,6 ml Na ₂ HPO ₄ | 6,4 |
| 65,3 ml KH ₂ PO ₄ + 34,7 ml Na ₂ HPO ₄ | 6,6 |

▼B

| | |
|--|-----|
| 53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4 | 6,8 |
| 41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4 | 7,0 |
| 29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4 | 7,2 |
| 19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4 | 7,4 |
| 12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4 | 7,6 |
| 7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4 | 7,8 |
| 3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4 | 8,0 |

▼B**C.8 TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE**

ESSAI SUR SOL ARTIFICIEL

1. MÉTHODE**1.1. INTRODUCTION**

Dans cet essai de laboratoire, la substance d'essai est ajoutée à un sol artificiel dans lequel les vers sont placés pendant 14 jours. Au bout de cette période (et facultativement au bout de 7 jours), l'effet létal de la substance sur les vers de terre est examiné. La méthode permet de déterminer assez rapidement l'effet de l'absorption dermique et de l'ingestion des produits chimiques sur les vers de terre.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉ

CL₅₀: concentration d'une substance considérée comme responsable de la mort de 50 % des animaux d'expérience pendant la durée de l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Une substance de référence est utilisée périodiquement pour démontrer que la sensibilité du système n'a pas changé de façon significative.

La substance de référence recommandée est le chloracétamide de qualité analytique.

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

Le sol étant un milieu variable, on utilise pour cet essai un sol limoneux artificiel soigneusement défini. Des vers de terre adultes de l'espèce *Eisenia foetida* (voir note en appendice) sont placés dans un sol artificiel défini, traité par différentes concentrations de la substance d'essai. Le contenu des récipients est étalé sur un plateau 14 jours (et facultativement 7 jours) après le début de l'essai et, pour chaque concentration, les vers de terre survivants sont comptés.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

L'essai est conçu pour être aussi reproductible que possible au point de vue du substrat et de l'organisme. Si la mortalité des témoins dépasse 10 % à la fin de l'essai, celui-ci n'est pas valide.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**1.6.1. Matériel****1.6.1.1. Substrat**

On utilise comme substrat de base un sol artificiel bien défini.

a) Substrat de base (les pourcentages sont exprimés en poids sec):

- 10 % de tourbe à sphaignes (de pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0, ne contenant pas de restes de plante visibles et finement broyée),

▼B

- 20 % d'argile kaolinique contenant si possible plus de 50 % de kaolinite,
- environ 69 % de sable quartzique industriel (essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules de granulométrie comprise entre 0,05 et 0,2 mm). Si la substance n'est pas suffisamment dispersible dans l'eau, 10 g par récipient doivent être mis de côté pour être mélangés ultérieurement à la substance à tester,
- environ 1 % de carbonate de calcium (CaCO_3) pulvérisé, chimiquement pur, pour ajuster le pH à $6,0 \pm 0,5$.

b) Substrat d'essai:

Le substrat pour les essais contient le substrat de base, la substance d'essai et de l'eau désionisée.

Le teneur en eau est d'environ 25 à 42 % du poids sec du substrat de base. La teneur en eau du substrat est déterminée par séchage d'un échantillon à 105 °C, jusqu'à ce que le poids reste constant. Le critère clé est que le sol artificiel doit être humidifié jusqu'à saturation. Le mélange doit être effectué soigneusement, de manière à obtenir une répartition uniforme de la substance d'essai et du substrat. La façon dont la substance d'essai est introduite dans le substrat doit être indiquée.

c) Substrat témoin:

Le substrat témoin contient le substrat de base et de l'eau. Si l'on utilise un additif, un substrat témoin supplémentaire doit contenir la même quantité d'additif.

1.6.1.2. R é c i p i e n t s

Récipients en verre d'une capacité d'environ 1 litre (convenablement recouverts de couvercles en plastique, de coupelles ou d'une feuille de plastique avec trous d'aération), remplis d'une quantité de substrat d'essai ou de substrat témoin humide équivalant à 500 g de substrat sec.

1.6.2. *Conditions expérimentales*

Les récipients doivent être déposés dans des locaux climatisés dont la température est maintenue à $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, sous éclairage continu compris entre 400 et 800 lux.

La durée de l'essai est de 14 jours, mais la mortalité peut être déterminée 7 jours après le début de l'essai.

1.6.3. *Méthode*

C o n c e n t r a t i o n s

Les concentrations de la substance d'essai sont exprimées en poids de substance par unité de substrat de base sec (mg/kg).

E s s a i d e s é l e c t i o n d e s c o n c e n t r a t i o n s à u t i l i s e r

La gamme des concentrations correspondant à des taux de mortalité allant de 0 à 100 % peut être déterminée par un essai renseignant sur l'intervalle de concentrations à utiliser dans l'essai définitif.

▼B

La substance doit être testée aux concentrations suivantes: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de substance/kg de substrat (poids sec).

Si un essai définitif complet est effectué, un lot par concentration et un lot témoin contenant chacun dix vers devraient être suffisants pour l'essai de sélection des concentrations à utiliser.

Essai définitif

Les résultats de l'essai de sélection des concentrations à employer sont utilisés pour choisir au moins 5 concentrations dans une série géométrique couvrant exactement l'intervalle de 0 à 100 % de mortalité et dans un rapport constant inférieur ou égal à 1,8.

Un essai utilisant cette série de concentrations devrait permettre d'évaluer avec la plus grande précision possible la valeur de la CL_{50} et de ses limites de confiance.

Pour l'essai définitif, on utilise au moins 4 lots par concentration et 4 lots témoins contenant chacun 10 vers. Les résultats de ces lots en parallèle sont exprimés sous la forme de moyenne et d'écart type.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 % et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50} .

Mélange du substrat de base et de la substance d'essai

Le substrat ne devrait pas, si possible, contenir d'autres additifs que de l'eau. Immédiatement avant le début de l'essai, une émulsion ou une dispersion de la substance d'essai dans de l'eau désionisée ou dans un autre solvant est mélangée au substrat de base ou uniformément projetée à sa surface à l'aide d'un pulvérisateur de chromatographie ou du même type.

Si elle est insoluble dans l'eau, la substance d'essai peut être dissoute dans le plus petit volume possible d'un solvant organique approprié (par exemple hexane, acétone ou chloroforme).

Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. Avant emploi, le substrat doit être aéré. La quantité d'eau évaporée doit être remplacée. Le substrat témoin doit contenir la même quantité de tout additif.

Si la substance d'essai n'est pas soluble, dispersible ou émulsifiable dans des solvants organiques, 10 g d'un mélange de sable quartzique finement broyé et d'une quantité de substance d'essai correspondant à la dose nécessaire pour traiter 500 g de sol artificiel sec sont mélangés à 490 g de substance d'essai sèche.

Pour chaque lot, une quantité de substrat humide équivalant à 500 g de poids sec est placée dans chaque récipient en verre et 10 vers de terre ayant été conditionnés pendant 24 heures dans un substrat de base humide analogue, puis rincés rapidement, l'eau excédentaire étant absorbée sur un papier-filtre sont placés à la surface du substrat.

▼B

Les récipients sont recouverts de couvercles, de coupelles ou d'une feuille en plastique perforé afin d'éviter le dessèchement du substrat et ils sont maintenus dans les conditions d'essai pendant 14 jours.

Les évaluations doivent être faites au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours). Le substrat est étalé sur une plaque de verre ou d'acier inoxydable. Les vers de terre sont examinés et le nombre de vers de terre survivants est déterminé. Les vers de terre sont considérés comme morts s'ils ne réagissent pas à un léger stimulus mécanique appliqué à leur extrémité antérieure.

Lorsque l'examen est fait au bout de 7 jours, le récipient est à nouveau rempli de substrat et les vers de terre survivants sont replacés sur le même substrat.

1.6.4. *Organismes d'expérience*

Les organismes d'expérience doivent être des *Eisenia foetida* adultes (voir note en appendice) (âgés d'au moins 2 mois, avec clitellum) — poids humide: 300 à 600 mg (pour la méthode d'élevage, voir appendice).

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT ET ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les concentrations de la substance d'essai sont consignées avec les pourcentages correspondants de vers de terre morts.

Si les données sont adéquates, la valeur de la CL_{50} et les intervalles de confiance ($p = 0,05$) sont déterminées à l'aide de méthodes standards (Litchfield et Wilcoxon, 1949 ou méthode équivalente). La CL_{50} doit être exprimée en milligrammes de la substance d'essai par kilogramme de substrat (poids sec).

Dans le cas où la pente de la courbe est trop accentuée pour permettre le calcul de la CL_{50} , il suffira de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 ou 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50} .

3. **PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- attestation de conformité de l'essai aux critères de qualité énoncés ci-dessus,
- essai effectué (essai de détermination des ordres de grandeur et/ou essai définitif),
- description précise des conditions d'essai ou attestation de conformité de l'essai, tout écart par rapport à la méthode étant indiqué,
- description précise de la manière dont la substance d'essai a été mélangée au substrat de base,
- information sur les organismes soumis à l'essai (espèce, âge, poids moyen et gamme de poids, conditions d'élevage, fournisseur),

▼B

- méthode appliquée pour déterminer la CL₅₀,
- résultat de l'essai, avec toutes les données utilisées,
- description des symptômes observés ou des modifications du comportement des organismes soumis à l'essai,
- mortalité chez les témoins,
- CL₅₀ ou concentration maximale testée n'ayant pas causé de mortalité et concentration minimale testée ayant causé 100 % de mortalité au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours),
- tracé de la courbe concentrations/réponses,
- résultats obtenus avec la substance de référence, au cours du présent essai ou de contrôles antérieurs de la qualité.

4.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 207, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pages.
- (3) Bouche, M- B., 1972, Lombriciens de France, Écologie et Systématique, Institut national de la recherche agronomique, 671 pages.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, 99 pages.
- (5) Commission des Communautés européennes, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B*Appendice***Élevage des vers avant les essais**

Trente à cinquante vers adultes sont introduits dans un récipient d'élevage contenant du substrat frais et en sont retirés au bout de 14 jours. Ces animaux peuvent être utilisés pour de nouveaux lots d'élevage. Les vers de terre sortis des cocons sont utilisés pour les essais lorsqu'ils sont arrivés à maturité (soit au bout de deux ou trois mois dans les conditions prescrites).

Conditions d'élevage

Local climatisé: température: 20 °C ± 2 °C, de préférence sous éclairage continu (intensité 400 à 800 lux).

Récipient d'élevage: récipients creux d'une capacité de 10 à 20 litres.

Substrat: l'*Eisenia foetida* peut être élevé avec différents excréments animaux. Il est recommandé d'utiliser comme milieu d'élevage un mélange en volume de 50 % de fumier de vache ou de cheval et de 50 % de tourbe. Le milieu doit avoir un pH d'environ 6 ou 7 (ajusté avec du carbonate de calcium) et une faible conductivité ionique (moins de 6 mmhos ou une concentration de sel de 0,5 %). Le substrat doit être humide, mais ne doit pas être trop mouillé.

Outre la méthode décrite ci-dessus, d'autres méthodes peuvent être utilisées.

Note: Il existe deux races d'*Eisenia foetida* que certains taxonomistes ont séparées en espèces (Bouche, 1972). Celles-ci sont morphologiquement semblables, mais l'une, *Eisenia foetida foetida*, se distingue par des rayures ou des bandes sur les segments, tandis que l'autre, *Eisenia foetida andrei*, n'en a pas et a une couleur rougeâtre aux nuances variées. Il convient d'utiliser si possible *Eisenia foetida andrei*. D'autres espèces peuvent être utilisées si l'on dispose de la méthodologie nécessaire.

▼B**C.9 BIODÉGRADATION****ESSAI DE ZAHN ET WELLENS****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

La présente méthode a pour but d'évaluer la biodégradabilité totale potentielle de substances organiques non volatiles solubles dans l'eau lorsqu'elles sont exposées à des concentrations relativement élevées de micro-organismes lors d'un essai statique.

Il peut y avoir adsorption physico-chimique sur les solides en suspension, et il convient d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Les substances à étudier sont utilisées dans des concentrations correspondant à des valeurs de COD allant de 50 à 400 mg/litre ou à des valeurs de DCO situées entre 100 et 1 000 mg/litre (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène). Ces concentrations relativement élevées assurent une bonne fiabilité analytique. Les composés possédant des propriétés toxiques peuvent ralentir ou empêcher le processus de dégradation.

Dans cette méthode, on emploie la mesure de la concentration du carbone organique dissous ou la demande chimique en oxygène pour évaluer la biodégradation finale de la substance d'essai.

L'emploi simultané d'une méthode analytique spécifique peut permettre d'évaluer la biodégradation primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration utilisée dans l'essai:

- sont solubles dans l'eau dans les conditions de l'essai,
- ont une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai,
- n'ont pas d'effets inhibiteurs vis-à-vis des bactéries,
- ne font pas l'objet d'une adsorption importante sur l'appareillage,
- ne disparaissent pas de la solution par formation de mousse.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

La connaissance de la toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes peut être intéressante pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

▼B

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le taux de dégradation obtenu à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité en essai de Zahn et Wellens»:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

dans laquelle:

D_T = biodégradation (%) au temps T,

C_A = valeurs du COD (ou de la DCO) du mélange d'essai mesurées 3 heures après le début de l'essai (mg/l) (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène),

C_T = valeurs du COD ou de la DCO du mélange d'essai au moment du prélèvement de l'échantillon (mg/l),

C_B = valeur du COD ou de la DCO du témoin au moment du prélèvement (mg/l),

C_{BA} = valeur du COD ou de la DCO du témoin mesurée 3 heures après le début de l'essai (mg/l).

Le taux de dégradation obtenu est arrondi au pourcentage entier le plus proche.

Le pourcentage de dégradation est défini comme étant le pourcentage de disparition du COD (ou de la DCO) de la substance d'essai.

La différence entre la valeur mesurée après 3 heures et la valeur initiale calculée ou, mieux, mesurée, peut donner des renseignements intéressants sur l'élimination de la substance (voir 3.2: Interprétation des résultats).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence peuvent parfois être utiles lors de l'étude de substances nouvelles; toutefois, des substances de référence spécifiques ne peuvent pas encore être recommandées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

On introduit la boue activée, les substances nutritives minérales et une solution aqueuse de la substance à examiner constituant la seule source de carbone dans un récipient en verre de 1 à 4 litres muni d'un agitateur et d'un aérateur. Le mélange est agité et aéré à une température de 20 à 25 °C, en lumière diffuse ou en chambre noire pendant une période pouvant aller jusqu'à 28 jours. Le processus de dégradation est suivi en déterminant la valeur du COD (ou de la DCO) dans la solution filtrée, quotidiennement ou selon une autre périodicité appropriée. Après chaque période, le COD (ou la DCO) éliminé est rapporté à la valeur constatée 3 heures après le début de l'essai et exprimé en pourcentage de biodégradation; cela constitue la mesure du taux de dégradation à ce moment. Le résultat rapporté graphiquement en fonction du temps donne la courbe de biodégradation.

Si on utilise une méthode analytique spécifique, on peut mesurer les variations de la concentration de la molécule originale dues à la biodégradation (biodégradabilité primaire).

▼B

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité de la méthode a été reconnue satisfaisante lors d'un essai d'intercomparaison

La sensibilité de la méthode est largement déterminée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination du carbone organique dissous et de la concentration de la substance dans le milieu d'essai.

1.6. DESCRIPTION

1.6.1. *Préparations*

1.6.1.1. Réactifs

Eau: eau potable contenant moins de 5 mg/l de carbone organique. La concentration totale d'ions calcium et magnésium ne doit pas dépasser 2,7 mmol/l; si ce n'est pas le cas, corriger la dilution par addition d'eau déionisée ou distillée.

Acide sulfurique, pureté analytique (P.A.): 50 g/l

Solution d'hydroxyde de soude P.A.: 40 g/l

Solution nutritive minérale: dissoudre dans un litre d'eau déionisée:

Chlorure d'ammonium, NH_4Cl , P.A.: 38,40 g

Dihydrogénophosphate de sodium, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.A.: 33,40 g

Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 , P.A.: 8,50 g

Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 , P.A.: 21,75 g

Le mélange sert à la fois de milieu nutritif et de solution tampon.

1.6.1.2. Appareillage

Récipients de verre contenant entre 1 et 4 litres (par exemple récipients cylindriques).

Dispositif d'agitation comprenant un agitateur en verre ou en métal fixé à une tige appropriées (l'agitateur doit décrire un mouvement rotatif à environ 5 à 10 cm au-dessus du fond du récipient). On peut utiliser également un agitateur magnétique muni d'un barreau de 7 à 10 cm de long.

Tube d'aération en verre de 2 à 4 mm de diamètre intérieur. L'ouverture du tube doit se trouver à environ 1 cm au-dessus du fond du récipient.

Centrifugeuse (environ 3 550 g).

pH-mètre.

Appareil pour la mesure de l'oxygène dissous.

Filtres papier.

▼B

Appareil de filtration sur membranes.

Membranes filtrantes, porosité: 0,45 µm. Les membranes filtrantes conviennent si elles ne libèrent pas de carbone et n'absorbent pas la substance au stade de la filtration.

Matériel d'analyse pour le dosage du carbone organique et la détermination de la demande chimique en oxygène.

1.6.1.3. Préparation de l'inoculum

Laver la boue activée provenant d'une station d'épuration biologique par centrifugations ou décantations successives dans l'eau utilisée pour l'essai (voir supra).

La boue activée doit avoir les caractéristiques requises. Cette boue peut être obtenue dans une station d'épuration en bon état de fonctionnement. Pour disposer d'autant d'espèces et de souches différentes de bactéries que possible, il peut être préférable de mélanger des inoculums provenant de sources différentes (par exemple de différentes stations d'épuration, d'extraits de sol, des eaux de rivière, etc.). Le mélange doit être traité comme indiqué plus haut.

Pour le contrôle d'activité de la boue activée, voir infra «Contrôle fonctionnel».

1.6.1.4. Préparation des solutions

Dans le récipient d'essai, ajouter 500 ml d'eau (voir supra), 2,5 ml/litre de solution minérale nutritive et une quantité de boues activées correspondant à 0,2-1,0 g/l de matière sèche dans le mélange final. Ajouter suffisamment de solution stock de la substance à tester de façon à obtenir dans le mélange final une concentration de COD de 50 à 400 mg/l. Les valeurs correspondantes de DCO sont 100-1 000 mg/l. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume total de 1 à 4 litres. Le volume total choisi dépend du nombre d'échantillons à prélever pour la détermination du COD ou de la DCO et du volume nécessaire pour l'analyse.

Normalement, on considère 2 litres comme un volume satisfaisant. Pour chaque série d'essais, préparer au moins un récipient témoin (blanc) contenant uniquement de la boue activée et la solution minérale nutritive, diluées avec de l'eau jusqu'au même volume total que dans les récipients d'essai.

1.6.2. Mode opératoire

Les récipients d'essai sont agités au moyen d'agitateurs magnétiques ou à hélice, en lumière diffuse ou en chambre noire, à une température de 20 à 25 °C. L'aération est assurée par injection d'air comprimé purifié par un filtre d'ouate et si nécessaire par un flacon laveur. Veiller à ce que la boue ne décante pas et que la concentration d'oxygène ne tombe pas au-dessous de 2 mg/l.

Vérifier le pH à intervalles réguliers (par exemple quotidiennement) et l'amener le cas échéant à pH 7-8.

▼B

Les pertes dues à l'évaporation sont compensées juste avant chaque prélèvement d'échantillon au moyen d'eau déionisée ou distillée. Une bonne méthode consiste à marquer le niveau du liquide sur le récipient avant de commencer l'essai. De nouvelles marques sont faites après chaque prélèvement (sans aération ni agitation). Les premiers échantillons sont toujours prélevés 3 heures après le début de l'essai de façon à permettre de détecter une adsorption de la substance d'essai sur la boue activée.

Pour suivre la dégradation de la substance d'essai, effectuer un dosage de COD ou de DCO quotidiennement ou à tout autre intervalle régulier. Filtrer les échantillons provenant du récipient d'essai et du récipient témoin sur un papier filtre soigneusement lavé. Éliminer les 5 premiers millilitres du filtrat de la solution d'essai. Les boues difficilement filtrables peuvent être éliminées au préalable par une centrifugation de 10 minutes. Les déterminations de COD et de DCO sont faites au moins en double. La durée des essais va jusqu'à 28 jours.

Note: Les échantillons restant troubles sont filtrés sur membranes. Celles-ci ne doivent ni libérer ni adsorber de matières organiques.

Contrôle fonctionnel des boues activées

Pour chaque série d'essais, on peut prévoir un récipient contenant une substance connue, de façon à pouvoir vérifier la capacité fonctionnelle de la boue activée. Le diéthylène glycol s'est révélé utile à cette fin.

Adaptation

Si des analyses sont effectuées à des intervalles relativement courts (par exemple quotidiennement), la courbe de dégradation peut faire clairement apparaître un phénomène d'adaptation (voir figure 2). L'essai ne devrait donc pas être commencé immédiatement avant un week-end.

Si l'adaptation se produit dans les derniers jours de l'essai, celui-ci peut être prolongé jusqu'à dégradation complète.

Note: Si une meilleure connaissance du comportement de la boue adaptée est nécessaire, on exposera à nouveau la même boue activée à la même substance d'essai suivant le mode opératoire ci-après:

Arrêter l'agitateur et l'aérateur et laisser décanter la boue activée. Éliminer le surnageant, remplir d'eau jusqu'à atteindre 2 litres, agiter pendant 15 minutes et laisser à nouveau décanter. Éliminer à nouveau le surnageant, et utiliser la boue restante pour répéter l'essai avec la même substance conformément aux paragraphes 1.6.1.4 et 1.6.2 ci-dessus. La boue activée peut également être séparée par centrifugation plutôt que par décantation.

La boue adaptée peut être mélangée avec de la boue fraîche pour atteindre 0,2 à 1 g de matière sèche par litre.

▼B**Analyses**

En général, on filtre les échantillons sur papier-filtre soigneusement lavé à l'eau déionisée.

Les échantillons qui restent troubles sont filtrés sur membranes (0,45 µm).

Déterminer la concentration de COD en double dans les filtrats des échantillons (éliminer les cinq premiers millilitres), à l'aide d'un appareil de mesure du COT. Si l'analyse du filtrat ne peut être faite le jour même, le conserver au réfrigérateur jusqu'au lendemain. Il est déconseillé de le conserver plus longtemps.

Déterminer la concentration de DCO dans les filtrats d'échantillon à l'aide du dispositif d'analyse de la DCO conformément au mode opératoire décrit dans la référence (2) ci-après.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Procéder au moins à deux déterminations de la concentration de COD et de DCO dans les échantillons, conformément aux indications fournies ci-dessus au paragraphe 1.6.2. Calculer le pourcentage de dégradation au temps T suivant la formule (avec ses définitions) donnée au paragraphe 1.2 ci-dessus.

Arrondir le taux de dégradation à l'unité de pourcentage la plus proche. Le taux de dégradation atteint à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité dans l'essai de Zahn-Wellens».

Note: Si la dégradation complète est réalisée avant la fin de la durée de l'essai et si ce résultat est confirmé par une seconde analyse effectuée le lendemain, il peut être mis fin à l'essai.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal de l'essai contiendra, si possible:

- la concentration initiale de la substance,
- toutes autres indications et les résultats expérimentaux relatifs à la substance testée, à la substance de référence éventuelle, et au témoin,
- la concentration après trois heures,
- la courbe de biodégradation avec description,
- la date et l'endroit du prélèvement de l'inoculum, stade d'adaptation, concentration utilisée, etc.,
- les raisons scientifiques d'éventuelles modifications de la procédure d'essai.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'élimination du COD (ou de la DCO) qui se produit graduellement pendant un certain nombre de jours ou de semaines indique que la substance testée se dégrade biologiquement.

▼B

Cependant, une adsorption physico-chimique peut jouer un rôle dans certains cas: ceci est montré lorsqu'il y a élimination totale ou partielle de la substance dès le début, lors des 3 premières heures, et que la différence entre le surnageant des milieux témoins et d'essai reste faible.

Des essais supplémentaires sont nécessaires si l'on doit faire la distinction entre biodégradation (ou biodégradabilité partielle) et adsorption.

Il y a pour cela plusieurs méthodes, la meilleure étant d'employer le surnageant comme inoculum dans un essai du niveau de base (de préférence un essai respirométrique).

Les substances donnant dans cet essai une élimination élevée, non liée à l'adsorption du COD (ou de la DCO) devraient être considérées comme potentiellement biodégradables. Une élimination partielle, non liée à l'adsorption, indique que le produit chimique est au moins biodégradable dans une certaine mesure. Une élimination faible ou nulle de COD (DCO) peut être due à l'inhibition des micro-organismes par la substance testée; ceci peut être révélé par lyse et perte de boue donnant des surnageants troubles. L'essai devrait être répété avec une concentration plus faible de substance.

L'emploi d'une méthode analytique spécifique ou d'une substance d'essai marquée au ^{14}C peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas de composés marqués au ^{14}C , la récupération de $^{14}\text{CO}_2$ confirmera qu'il y a eu biodégradation.

Quand les résultats sont exprimés en termes de biodégradation primaire, il conviendrait de fournir dans la mesure du possible une explication concernant le changement de structure chimique qui a conduit à une diminution de réponse de la substance d'origine.

La validation de la méthode analytique doit être accompagnée de l'indication de la réponse trouvée avec le témoin.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 302 B, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Annexe V, C. 9. «Dégradation: demande chimique en oxygène», de la directive 84/449/CEE, Journal officiel des Communautés européennes n° L 251 du 19 septembre 1984.



Appendice

EXEMPLE D'ÉVALUATION

| | |
|--------------------------|--|
| Composé organique: | acide 4-éthoxybenzoïque |
| Concentration théorique: | 600 mg/l |
| COD théorique: | 390 mg/l |
| Inoculum: | Station d'épuration des eaux d'égout de ... |
| Concentration; | 1 gramme de matière sèche par litre |
| État d'adaptation: | non adapté |
| Analyse: | détermination du COD |
| Volume de l'échantillon: | 3 ml |
| Substance de contrôle: | diéthylèneglycol |
| Toxicité du composé: | sans effet toxique au-dessous de 1 000 mg/l |
| | Essai pratique: essai des tubes de fermentation. |

| Temps | Substance de contrôle | | | | Substance à étudier | | |
|----------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------|------------------|----------------------------|-----------------|------------------|
| | Blanc COD ⁽¹⁾ mg/l | COD ⁽¹⁾ mg/l | COD net mg/l | Dégradation % | COD ⁽¹⁾ mg/l | COD net mg/l | Dégradation % |
| 0 | — | — | 300,0 | — | — | 390,0 | — |
| 3 heures | 4,0 | 298,0 | 294,0 | 2 | 371,6 | 367,6 | 6 |
| 1 jour | 6,1 | 288,3 | 282,2 | 6 | 373,3 | 367,2 | 6 |
| 2 jours | 5,0 | 281,2 | 276,2 | 8 | 360,0 | 355,0 | 9 |
| 5 jours | 6,3 | 270,5 | 264,2 | 12 | 193,8 | 187,5 | 52 |
| 6 jours | 7,4 | 253,3 | 245,9 | 18 | 143,9 | 136,5 | 65 |
| 7 jours | 11,3 | 212,5 | 201,2 | 33 | 104,5 | 93,2 | 76 |
| 8 jours | 7,8 | 142,5 | 134,7 | 55 | 58,9 | 51,1 | 87 |
| 9 jours | 7,0 | 35,0 | 28,0 | 91 | 18,1 | 11,1 | 97 |
| 10 jours | 18,0 | 37,0 | 19,0 | 94 | 20,0 | 2,0 | 99 |

⁽¹⁾ Valeurs moyennes de trois déterminations.

▼B

Figure 1

Exemples de courbes de biodégradation

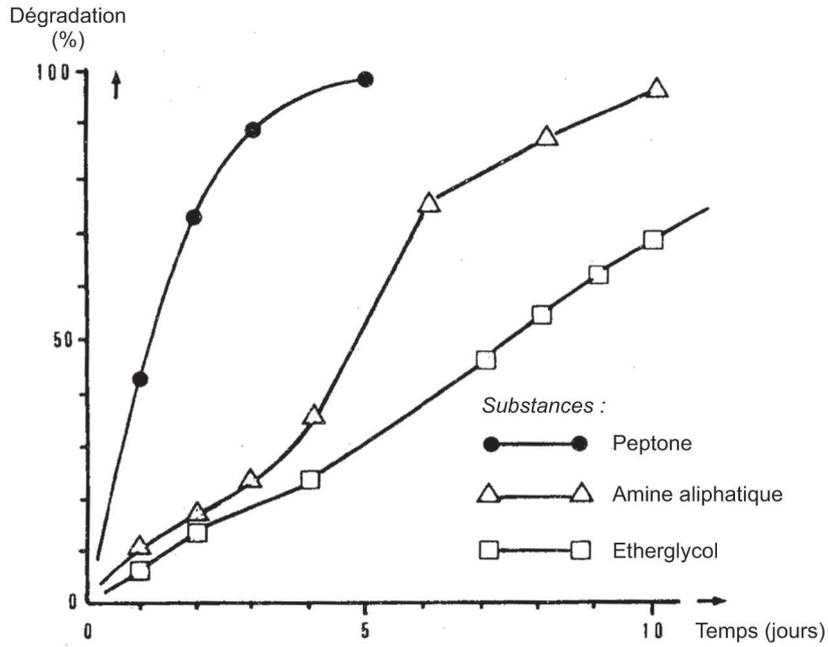
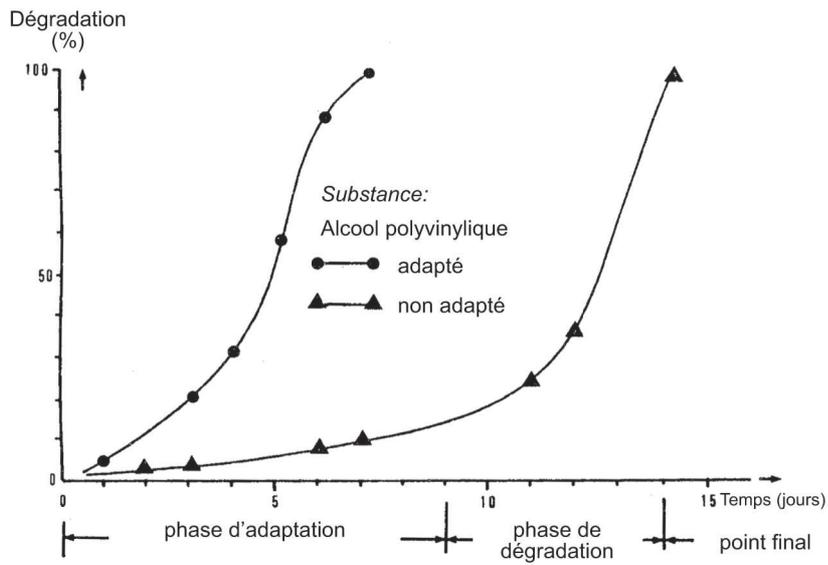


Figure 2

Exemples d'adaptation d'une boue



▼ **M4****C.10. ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS****C.10-A: Unités de traitement par boues activées**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 303 (2001) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Dans les années 50, on s'est rendu compte que les nouveaux tensioactifs provoquaient un gonflement excessif de la mousse dans les stations de traitement des eaux usées et les cours d'eau. Ils n'étaient pas complètement éliminés par le traitement aérobie et limitaient dans certains cas l'élimination d'autres matières organiques. Ce constat a été à l'origine de nombreuses études sur les moyens d'éliminer les tensioactifs des eaux usées et sur les possibilités d'application des nouvelles substances chimiques produites par l'industrie au traitement des eaux usées. Des modèles d'unités représentant les deux principaux types de traitement biologique aérobie des eaux usées (boues activées et lits à ruissellement, ou lits bactériens) ont été utilisés à cette fin. Il aurait en effet été peu commode et très coûteux de répartir chaque nouvelle substance entre différentes stations de traitement à grande échelle et d'assurer un suivi des essais, même au niveau local.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

Unités de traitement par boues activées

2. Les descriptions de modèles d'unités à boues activées mentionnent des dimensions comprises entre 300 ml et environ 2 000 ml. Certaines unités, répliques assez fidèles de stations en vraie grandeur, comportaient des bassins de décantation où les boues séjournaient avant d'être renvoyées par pompage dans le bassin d'aération, tandis que d'autres n'étaient pas équipées pour cette opération, par exemple le modèle de Swisher (1). La dimension de l'appareil résulte d'un compromis: il doit être assez grand pour fonctionner correctement sur le plan mécanique et traiter un volume d'échantillons suffisant sans que son fonctionnement en soit altéré et, d'autre part, il ne doit pas occuper trop d'espace ni demander une quantité de matériel excessive.
3. Deux types d'appareils, appliqués au départ à l'étude des tensioactifs, ont été abondamment utilisés avec des résultats satisfaisants: les unités d'Husmann (2) et les unités à vase poreux (3) (4), qui sont décrites dans la présente méthode d'essai. D'autres unités ont également fait leurs preuves, par exemple celle d'Eckenfelder (5). Compte tenu du coût relativement élevé et des efforts exigés par la conduite de cet essai de simulation, des essais de sélection plus simples et moins onéreux, qui figurent à présent au chapitre C.4-A à F de la présente annexe (6), ont été étudiés en parallèle. L'expérience acquise avec de nombreux tensioactifs et d'autres produits chimiques a montré que ceux qui donnaient un résultat positif aux essais de sélection (facilement biodégradables) se dégradaient aussi au cours de l'essai de simulation. Certaines des substances rejetées par les essais de sélection étaient acceptées d'après les essais de biodégradabilité intrinsèque [chapitres C.12 (7) et C.19 (8) de la présente annexe] mais une partie seulement des substances formant ce dernier groupe se dégradait au cours de l'essai de simulation, tandis que les substances écartées par les essais de biodégradabilité intrinsèque n'étaient pas dégradées au cours des essais de simulation (9) (10) (11).
4. Les essais de simulation conduits sous une seule combinaison de conditions expérimentales suffisent à remplir certains objectifs; les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination de la substance d'essai ou du carbone organique dissous (COD). Ce type d'essai est décrit dans la présente méthode d'essai. Toutefois, contrairement à la précédente version du présent chapitre, qui n'abordait qu'un seul type d'appareil traitant des eaux usées synthétiques en mode couplé suivant une méthode relativement

▼ **M4**

grossière d'épuisement des boues, le présent texte propose plusieurs variations. Il présente plusieurs options concernant les types d'appareil, les modes de fonctionnement, les eaux usées et l'évacuation des boues épuisées. Il s'aligne étroitement sur la norme ISO 11733 (12), qui a été examinée très attentivement durant sa préparation, bien que la méthode n'ait pas fait l'objet d'un essai circulaire.

5. Pour d'autres objectifs, il est nécessaire de connaître la concentration de la substance d'essai dans l'effluent avec plus de précision, ce qui demande une méthode plus élaborée. Le débit des boues épuisées, par exemple, doit subir un contrôle plus précis durant chaque journée d'essai et sur toute la période de l'essai, et il faut faire tourner les unités à plusieurs débits de boues épuisées. Pour que l'étude soit plus complète, les essais doivent aussi être menés à deux ou trois températures différentes: le mode opératoire est exposé par Birch (13) (14) et résumé à l'appendice 6. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de décréter quels modèles cinétiques sont applicables à la biodégradation des produits chimiques lors du traitement des eaux usées et dans le milieu aquatique en général. La cinétique de Monod, donnée à titre d'exemple à l'appendice 6, est limitée aux substances dont la concentration atteint au moins 1 mg/l, mais de l'avis de certains, même sous cette condition, cela reste à démontrer. Des essais réalisés à des concentrations plus proches de celles trouvées dans les eaux usées sont présentés à l'appendice 7, mais ces essais et ceux de l'appendice 6 ne figurent qu'en appendices et ne font pas l'objet de méthodes d'essai.

Lits

6. Les modèles de lits percolateurs ont beaucoup moins retenu l'attention, sans doute parce qu'ils sont plus encombrants et moins compacts que les modèles de stations à boues activées. Gerike *et al.* ont mis au point des unités à lits percolateurs qu'ils ont fait fonctionner en mode couplé (15). Ces lits étaient relativement grands (hauteur 2 m; volume 60 l) et demandaient pas moins de 2 l/h d'eaux usées chacun. Baumann *et al.* (16) ont simulé des lits percolateurs en insérant dans des tubes de 1 m (14 mm de diamètre interne) des bandes de polyester «velues» préalablement plongées dans des boues activées concentrées pendant 30 minutes. La substance d'essai, qui constituait la seule source de carbone dans une solution de sels minéraux, était introduite par le haut du tube vertical et la biodégradation était évaluée d'après les mesures du COD dans l'effluent et du CO₂ dans les dégagements gazeux.
7. Les filtres biologiques ont été simulés d'une autre manière (15): on a alimenté les surfaces internes de tubes rotatifs légèrement inclinés par rapport à l'horizontale d'eaux usées (environ 250 ml/h) avec et sans la substance d'essai, puis recueilli les effluents pour analyse du COD et/ou de la substance d'essai étudiée.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Cette méthode a été conçue pour déterminer l'élimination et la biodégradation primaire et/ou finale de substances organiques solubles dans l'eau par des micro-organismes aérobies dans un système d'essai à fonctionnement continu et simulant l'action des boues activées. Un milieu organique facilement biodégradable et la substance d'essai organique forment la source de carbone et d'énergie des micro-organismes.
9. Deux unités d'essai à fonctionnement continu (stations à boues activées ou vases poreux) tournent en parallèle dans des conditions identiques choisies en fonction de la finalité de l'essai. Normalement, le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h et l'âge moyen des boues (temps de rétention des boues) est de 6 à 10 jours. Les boues sont épuisées par application de l'une des deux méthodes et la substance d'essai est habituellement ajoutée à une concentration comprise entre 10 et 20 mg/l de carbone organique dissous (COD) aux eaux à traiter (milieu organique) d'une seule des unités. La deuxième unité sert de témoin pour déterminer la biodégradation dans le milieu organique.

▼ M4

10. Le COD, de préférence, ou la demande chimique en oxygène (DCO), ainsi que la concentration de la substance d'essai (si nécessaire), sont déterminés par une analyse spécifique conduite sur des échantillons d'effluents fréquemment prélevés de l'unité qui reçoit la substance d'essai. On suppose que la différence de concentration du COD ou de la DCO dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est due à la substance d'essai ou à ses métabolites organiques. On la compare ensuite à la concentration du COD ou de la DCO dans les eaux à traiter attribuable à la substance d'essai, afin de déterminer les quantités de substance d'essai éliminées.
11. On parvient normalement à distinguer la biodégradation de la bioadsorption en étudiant attentivement la courbe d'élimination en fonction du temps, et elle peut ordinairement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate conduit à l'aide d'un inoculum acclimaté provenant de l'unité qui reçoit la substance d'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

12. Il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai pour être en mesure d'interpréter les résultats correctement. Les substances volatiles et insolubles ne peuvent normalement être testées sans précautions particulières (voir appendice 5). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO), le carbone organique dissous (COD) et la demande chimique en oxygène (DCO).
13. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées, et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

14. Dans l'application initiale de cet essai de simulation (de confirmation) à la biodégradation primaire des tensioactifs, la mise sur le marché du tensioactif était subordonnée à un taux d'élimination supérieur à 80 pour cent. À défaut d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Les résultats ont tendance à être de type tout ou rien. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.
15. Relativement peu de substances chimiques, par exemple des tensioactifs, sont présentes dans les eaux usées aux concentrations (environ 10 mg C/l) appliquées dans cet essai. Certains produits chimiques peuvent être inhibiteurs à de telles concentrations, tandis que la cinétique d'élimination d'autres substances risque d'être différente aux faibles concentrations. Il est possible d'évaluer la dégradation avec plus de précision en recourant à des méthodes modifiées et en choisissant des concentrations de la substance d'essai réalistement faibles; les résultats obtenus pourraient servir à calculer les constantes cinétiques. Cependant, non seulement les techniques expérimentales ne sont pas encore entièrement validées, mais les modèles cinétiques, qui reproduisent les réactions de biodégradation, n'ont pas été établis (voir appendice 7).

▼ **M4**

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

16. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances dont le comportement est connu, parallèlement aux substances d'essai étudiées. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du bnaphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS DES ESSAIS

17. Il existe beaucoup moins de rapports d'essais de simulation que de rapports d'essais de biodégradabilité immédiate. La reproductibilité entre essais conduits simultanément est bonne (de 10 à 15 pour cent) pour des substances d'essai dégradées à 80 pour cent ou plus, mais la variabilité augmente pour les substances moins bien dégradées. Certaines substances limites ont donné des résultats très disparates (par exemple 10 pour cent, 90 pour cent) à différentes reprises au cours des neuf semaines de l'essai.
18. Les résultats obtenus à l'aide des deux types d'appareils ne différaient guère, mais certaines substances ont subi une dégradation plus poussée et plus constante avec les eaux usées domestiques qu'avec les eaux usées synthétiques reconstituées selon la formule de l'OCDE.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareils*Système d'essai*

19. Le système d'essai d'une seule substance comprend une unité d'essai et une unité témoin, mais les analyses spécifiques (biodégradation primaire) ne demandent qu'une unité d'essai. Une unité témoin peut servir à plusieurs unités d'essai recevant des substances d'essai identiques ou différentes. En cas de couplage (appendice 3), chaque unité d'essai doit avoir sa propre unité témoin. Le système d'essai peut consister en un modèle de station à boues activées: unité d'Husmann (appendice 1, figure 1) ou vase poreux (appendice 1, figure 2). Dans les deux cas, il faut employer des récipients de stockage de capacité suffisante pour accueillir les eaux à traiter et les effluents ainsi que des pompes pour doser les eaux à traiter, mélangés ou non à la solution contenant la substance d'essai.
20. Chaque unité à boues activées se compose d'un récipient d'aération d'une capacité connue de quelque trois litres de boues activées et d'un décanteur secondaire qui contient environ un litre et demi; il est possible de modifier les volumes dans une certaine mesure en ajustant la hauteur du décanteur. L'utilisation de récipients de dimensions différentes est permise à condition de leur faire supporter des charges hydrauliques comparables. S'il n'y a pas moyen de maintenir la température de l'enceinte d'essai dans la gamme souhaitée, on recommande d'employer des récipients à chemise d'eau thermostatée. Les boues activées du décanteur sont ramenées dans le récipient d'aération, en continu ou à intervalles réguliers, à l'aide d'un émulseur à air ou d'une pompe doseuse, pour y être recyclée.
21. Le système du vase poreux consiste en un cylindre poreux à fond conique placé à l'intérieur d'un récipient légèrement plus grand de la même forme, mais fabriqué en matière plastique imperméable. Le matériau qui convient au cylindre poreux est du polyéthylène de 2 mm d'épaisseur dont les pores n'excèdent pas 90 µm. La séparation des boues et du milieu organique traité est opérée par un passage différentiel à travers la paroi poreuse. Les effluents se déversent dans l'espace annulaire d'où ils débordent dans le récipient collecteur. Aucune décantation n'a lieu, si bien qu'il n'y a pas de retour de boues. L'ensemble du système peut être monté dans un bain-marie thermostaté. Les vases poreux s'obstruent et risquent de déborder au début.

▼ **M4**

Si cela se produit, il faut remplacer le revêtement poreux interne par un revêtement propre en commençant par siphonner les boues du vase dans un seau propre avant d'enlever le revêtement obstrué. Après avoir essuyé le cylindre imperméable extérieur, on place un revêtement propre et on remet la boue dans le vase. Si des boues adhèrent sur les côtés du revêtement obstrué, celles-ci doivent être soigneusement grattées et transférées. Le nettoyage des vases obstrués s'effectue d'abord à l'aide d'un mince jet d'eau pour enlever les boues restantes, ensuite par trempage dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium, puis dans l'eau, et s'achève par un rinçage complet à l'eau.

22. Il convient d'appliquer des techniques appropriées à l'aération des boues dans les récipients d'aération des deux systèmes, par exemple des cubes frittés (pierres diffuseuses) et de l'air comprimé. Si nécessaire, l'air sera épuré par passage à travers un filtre convenable, et lavé. Une quantité d'air suffisante doit être insufflée dans le système pour maintenir l'aérobiose et conserver les boues à l'état de floc pendant toute la durée de l'essai.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

23. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominal de 0,45 µm) qui adsorbe les substances organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s² peut remplacer l'appareil de filtration.

Matériel d'analyse

24. Appareils permettant de déterminer:
- le COD (carbone organique dissous) et le COT (carbone organique total), ou la DCO (demande chimique en oxygène),
 - la substance donnée, s'il y a lieu,
 - les solides en suspension, le pH, la concentration d'oxygène dans l'eau,
 - la température, l'acidité, l'alcalinité,
 - l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si l'essai est réalisé dans des conditions nitrifiantes.

Eau

25. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD. Mesurer l'alcalinité si elle est inconnue.
26. Eau désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

Milieu organique

27. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Il a été démontré (11) (14) que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD et entraînaient même l'élimination et la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE. En outre, l'addition constante ou intermittente d'eaux usées domestiques stabilise souvent les boues activées, y compris sa capacité à décanter convenablement, laquelle est déterminante. Aussi préconise-t-on l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogencarbonate de sodium ou dihydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ 7,5 ± 0,5 dans le récipient d'aération durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas. Lorsqu'on utilise des mélanges de façon continue ou intermittente, le COD (ou la DCO) de ces mélanges doivent être maintenus à une valeur à peu près constante, par exemple par dilution dans l'eau.

▼ **M4***Eaux usées synthétiques*

28. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. Utiliser en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Si les eaux à traiter doivent être moins concentrées, diluer les eaux usées synthétiques, à 1/1 par exemple, dans de l'eau du robinet afin d'obtenir une concentration d'environ 50 mg/l. Ces eaux à traiter «allégées» favoriseront la croissance des organismes nitrifiants; cette modification devra être mise à profit au cas où s'avère nécessaire l'étude de la simulation de stations d'épuration des eaux usées en régime nitrifiant. Ces eaux usées synthétiques, à base d'eau distillée, peuvent être confectionnées sous une forme concentrée et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un apport supplémentaire de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

29. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées avant la sédimentation primaire, au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux brutes de la station de traitement par boues activées. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage (généralement pas plus de sept) à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'ont pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Boues activées

30. Prélever les boues activées destinées à l'inoculation dans la cuve d'aération d'une station d'épuration des eaux usées correctement exploitée ou d'une unité à boues activées conçue à l'échelle expérimentale traitant principalement des eaux usées domestiques.

Solutions mères de la substance d'essai

31. Pour les substances présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances insolubles et volatiles, se reporter à l'appendice 5. Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique de la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle doit normalement dépasser 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est applicable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

▼ **M4**

32. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à $\text{pH } 7 \pm 0,5$ avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

33. Le mode opératoire est décrit pour les unités à boues activées; pour le système du vase poreux, il doit être légèrement adapté.

Préparation de l'inoculum

34. Au début de l'essai, inoculer le système d'essai avec des boues activées ou un inoculum contenant une faible concentration de micro-organismes. L'inoculum est conservé dans un endroit aéré à température ambiante avant d'être utilisé dans les 24 heures. Dans le premier cas, on prélève un échantillon de boues activées de la cuve d'aération d'une station d'épuration biologique des eaux usées exploitée avec efficacité ou d'une installation de traitement de laboratoire qui soit essentiellement alimentée par des eaux usées domestiques. S'il y a lieu de simuler des conditions nitrifiantes, collecter les boues d'une station de traitement des eaux usées en régime nitrifiant. Déterminer la concentration des solides en suspension et, si nécessaire, concentrer les boues par décantation pour que le volume ajouté au système d'essai soit minimal. Vérifier que la teneur en matière sèche de départ tourne autour de 2,5 g/l.
35. Dans le deuxième cas, 2 ml/l à 10 ml/l d'un effluent d'une station d'épuration biologique des eaux usées constitueront l'inoculum. Afin de réunir autant d'espèces bactériennes que possible, il peut être utile d'ajouter des inoculum de diverses autres sources, par exemple les eaux de surface. Dans ces conditions, les boues activées vont se former et se développer dans le système d'essai.

Dosage du milieu organique

36. Nettoyer méticuleusement les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci. Assembler les systèmes d'essai dans une pièce thermostatée (normalement entre 20 et 25 °C) ou utiliser des unités d'essai à chemise d'eau. Préparer un volume suffisant du milieu organique requis (paragraphe 27-29). Commencer par remplir le récipient d'aération et le décanteur avant d'introduire l'inoculum (paragraphe 34, 35). Actionner le dispositif d'aération de telle sorte que les boues soient maintenues en suspension et en aérobiose, et entamer le dosage des eaux à traiter et le recyclage des boues décantées. Doser le milieu organique des récipients de stockage et introduire ce dernier dans les récipients d'aération (paragraphe 20, 21) des unités d'essai et témoin et recueillir leurs effluents respectifs dans des récipients de stockage similaires. Le temps de rétention hydraulique normal de 6 heures sera assuré par un pompage du milieu organique à raison de 0,5 l/h. Pour confirmer ce débit, mesurer la quantité quotidienne de milieu organique dosé en enregistrant la diminution de volume du milieu dans les récipients de stockage. Il faudrait faire appel à d'autres méthodes de dosage pour déterminer les effets du déversement intermittent et du traitement de «choc» par des produits chimiques.
37. Si le milieu organique est préparé en vue d'une utilisation dont la durée dépasse un jour, il y a lieu de le réfrigérer à environ 4 °C ou de le conserver par une autre méthode adéquate, afin de prévenir la croissance des micro-organismes et la biodégradation en dehors des unités d'essai (paragraphe 29). Si l'on emploie une eau usée synthétique, il est possible de préparer et d'entreposer à environ 4 °C une solution mère concentrée (par exemple dix fois la concentration normale, voir paragraphe 28). Cette solution mère peut être convenablement mélangée à un volume adéquat d'eau du robinet avant usage, ou être pompée directement, tandis que le volume adéquat d'eau du robinet est pompé séparément.

▼ **M4***Dosage de la substance d'essai*

38. Un volume approprié de la solution mère de la substance d'essai (paragraphe 31) est introduit dans le récipient de stockage des eaux à traiter ou dosé directement, à l'aide d'une autre pompe, dans le récipient d'aération. La concentration d'essai moyenne normale dans les eaux à traiter doit se situer entre 10 mg/l et 20 mg/l de COD, et la concentration maximale à 50 mg/l. Si l'hydrosolubilité de la substance d'essai est faible ou si des effets toxiques risquent de se produire, abaisser la concentration à 5 mg/l de COD ou même moins, mais seulement si une méthode d'analyse spécifique est applicable (les substances d'essai dispersées peu solubles dans l'eau peuvent être ajoutées par le biais de techniques de dosage spéciales, voir appendice 5).
39. Une fois que le système est stabilisé et élimine le COD du milieu organique avec efficacité (environ 80 pour cent), commencer à ajouter la substance d'essai. Il est important de vérifier que toutes les unités travaillent avec le même rendement avant d'ajouter la substance d'essai; si ce n'est pas le cas, il est souvent utile de mélanger les différentes boues et de redistribuer des volumes égaux aux unités. Lorsqu'on utilise un inoculum de quelque 2,5 g/l (poids sec) de boues activées, la substance d'essai peut être ajoutée dès le début de l'essai, car l'addition directe de quantités croissantes dès le départ offre l'avantage de pouvoir rendre les boues activées mieux adaptables à la substance d'essai. Quelles que soient les modalités de l'adjonction de la substance d'essai, il est recommandé de mesurer les débits et/ou les volumes correspondants dans le(s) récipient(s) de stockage à intervalles réguliers.

Manipulation des boues activées

40. La concentration des solides des boues activées se stabilise normalement durant l'essai, quel que soit l'inoculum utilisé, entre 1 et 3 g/l (poids sec) suivant la qualité et la concentration du milieu organique, les conditions expérimentales, la nature des micro-organismes présents et l'influence de la substance d'essai.
41. Déterminer les solides en suspension dans les récipients d'aération au moins une fois par semaine en jetant les boues excédentaires, afin de maintenir la concentration entre 1 g/l et 3 g/l (poids sec), ou veiller à la constance de l'âge moyen des boues, qui doit généralement se situer entre 6 et 10 jours. Si l'on choisit, par exemple, un temps de rétention des boues de 8 jours, on enlèvera chaque jour 1/8 du volume des boues activées dans le récipient d'aération et on le jettera. Effectuer cette opération quotidiennement ou, de préférence, utiliser une pompe automatique intermittente. Le maintien de la concentration des solides en suspension à une valeur constante ou entre des limites étroites ne fige pas le temps de rétention des boues, qui est la variable permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans l'effluent.
42. Tout au long de l'essai, ôter au moins une fois par jour la boue qui adhère aux parois du récipient d'aération et du décanteur et remettre cette dernière en suspension. Inspecter et nettoyer régulièrement tous les tuyaux afin de prévenir la croissance d'un biofilm. Recycler les boues décantées du décanteur en la renvoyant dans le récipient d'aération, de préférence par pompage intermittent. Le système des vases poreux ne comporte pas de recyclage, mais il faut veiller à placer des cylindres internes propres avant que le volume n'atteigne une croissance significative dans le récipient (paragraphe 21).
43. Une mauvaise décantation et des pertes de boues peuvent se produire dans les unités d'Husmann. On peut y remédier en effectuant en parallèle dans les unités d'essai et les unités témoin une ou plusieurs des opérations énumérées ci-dessous:
- ajouter des boues fraîches ou un floculant (2 ml par récipient d'une solution de FeCl_3 à 50 g/l, par exemple) à intervalles réguliers, par exemple hebdomadaires, en s'assurant que le FeCl_3 ne réagit pas avec la substance d'essai et ne la fasse pas précipiter,

▼ **M4**

- remplacer l'émulseur à air par une pompe péristaltique, afin d'instaurer un flux de recirculation des boues à peu près égal au débit entrant à appliquer et de permettre la formation d'une zone anaérobie dans les boues décantées (la géométrie du dispositif airlift limite le débit minimum du retour des boues à environ douze fois celui des eaux à traiter),
- pomper les boues, par intermittence, du décanteur vers le récipient d'aération (par exemple pendant 5 minutes toutes les 2,5 heures afin de recycler 1 à 1,5 l/h,
- utiliser un agent antimousse non toxique à une concentration minimale pour empêcher les pertes dues à la formation de mousse (de l'huile de silicone, par exemple),
- insuffler de l'air à travers les boues dans le décanteur par puissantes saccades (par exemple pendant 10 secondes toutes les heures),
- doser le milieu organique par intervalles dans le récipient d'aération (par exemple pendant 3 à 10 minutes toutes les heures).

Échantillonnage et analyse

44. À intervalles réguliers, mesurer la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH des boues activées dans les récipients d'aération. Faire en sorte qu'il y ait toujours suffisamment d'oxygène disponible (> 2 mg/l) et que la température demeure dans la gamme requise (normalement de 20 °C à 25 °C). Maintenir le pH à $7,5 \pm 0,5$ en dosant de petites quantités d'une base ou d'un acide inorganiques que l'on introduit dans le récipient d'aération ou dans les eaux à traiter, ou en augmentant le pouvoir tampon du milieu organique (voir paragraphe 27). Si une nitrification a lieu, elle génère de l'acide, l'oxydation de 1 mg d'azote produisant l'équivalent de quelque 7 mg de CO₃. La fréquence des mesures dépend du paramètre à mesurer et de la stabilité du système, et peut varier entre une cadence journalière et hebdomadaire.
45. Déterminer le COD ou la DCO dans les eaux à traiter des récipients d'essai et témoins. Mesurer la concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes par une analyse spécifique ou estimer cette variable d'après la concentration dans la solution mère (paragraphe 31), le volume utilisé et la quantité d'eaux usées dosées dans l'unité d'essai. Il est recommandé de calculer la concentration de la substance d'essai afin de réduire la variabilité des données relatives à la concentration.
46. Prélever des échantillons appropriés dans l'effluent recueilli (par exemple des échantillons composites sur 24 heures) qui seront filtrés à travers une membrane à pores de 0,45 µm ou centrifugés à environ 40 000 m/s² pendant près d'un quart d'heure. Il convient de recourir à la centrifugation si la filtration pose des difficultés. Déterminer le COD ou la DCO au moins deux fois, afin de mesurer par une analyse spécifique de la substance d'essai la biodégradation finale et, selon les besoins, la biodégradation primaire.
47. L'utilisation de la DCO peut donner lieu à des problèmes analytiques aux faibles concentrations et n'est donc recommandée que si la concentration d'essai est suffisante (environ 30 mg/l). S'agissant de substances très adsorbantes, on préconise de mesurer la quantité de substance adsorbée dans les boues par une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai.
48. La fréquence de l'échantillonnage dépend de la durée supposée de l'essai. Un rythme de trois fois par semaine est recommandé. Une fois que les unités fonctionnent de manière efficace, on leur laisse une période d'adaptation de une à six semaines maximum après l'introduction de la substance d'essai, afin de leur permettre d'atteindre un état stationnaire. Il faut, de préférence, obtenir au moins 15 valeurs valables pendant la phase plateau (paragraphe 59), qui dure normalement trois semaines, pour évaluer le résultat de l'essai. L'essai peut s'arrêter là si l'on a atteint un degré d'élimination suffisant (par exemple supérieur à 90 pour cent) et si l'on possède ces 15 valeurs issues d'analyses conduites chaque jour de semaine pendant trois semaines. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après l'addition de la substance d'essai.

▼ M4

49. Si les boues sont nitrifiantes et que les effets de la substance d'essai sur la nitrification sont à étudier, analyser des échantillons prélevés dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin, au moins une fois par semaine pour l'ammonium et/ou les nitrites et nitrates.
50. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible, en particulier celles qui portent sur l'azote. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, on les conservera par congélation, acidification (par exemple 10 ml/l d'une solution d'acide sulfurique à 400 g/l) ou par adjonction d'un toxique approprié [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Couplage des unités d'essai

51. Si l'on effectue un couplage (appendice 3), échanger quotidiennement la même quantité de boues activées (de 150 ml à 1 500 ml pour les récipients d'aération contenant trois litres de liquide) entre les récipients d'aération de l'unité d'essai et de l'unité témoin. Si la substance d'essai s'adsorbe fortement sur les boues, n'échanger que le surnageant des décanteurs. Introduire dans les deux cas un facteur de correction dans le calcul des résultats de l'essai (paragraphe 55).

RÉSULTATS ET RAPPORT**Traitement des résultats**

52. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD ou de DCO pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de l'équation suivante:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

où

D_t = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO à l'instant t ;

C_s = COD ou DCO dans les eaux à traiter, induits par la substance d'essai, estimés de préférence à partir de la solution mère (mg/l);

E = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

53. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin est utile pour évaluer l'activité de biodégradation des boues activées pendant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

où

D_B = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin à l'instant t ;

C_M = COD ou DCO du milieu organique des eaux brutes témoins (mg/l).

▼ M4

Calculer, facultativement, le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO engendrés par le milieu organique et la substance d'essai dans l'unité d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

où

D_T = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO dans la totalité des eaux brutes d'essai;

C_T = COD ou DCO de la totalité des eaux brutes d'essai ou calculés à partir des solutions mères (mg/l).

54. Calculer l'élimination de la substance d'essai si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique à chaque instant d'évaluation, selon l'équation suivante:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

où

D_{ST} = pourcentage d'élimination primaire de la substance d'essai à l'instant t ;

S_i = concentration mesurée ou estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l);

S_e = concentration mesurée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai à l'instant t (mg/l).

55. En mode couplé, compenser la dilution de la substance d'essai dans le récipient d'aération, occasionnée par l'échange de boues, par un facteur de correction (voir appendice 3). Si on a appliqué un temps de rétention hydraulique moyen de six heures et échangé la moitié du volume de boues activées contenu dans le récipient d'aération, il faut corriger les valeurs déterminées de l'élimination quotidienne (D_t , paragraphe 52) afin d'obtenir le degré réel d'élimination, D_{tc} , de la substance d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Expression des résultats de l'essai

56. Tracer une courbe des pourcentages d'élimination D_t (ou D_{tc}) et D_{ST} , le cas échéant, en fonction du temps (voir appendice 2). Certaines conclusions peuvent être tirées de l'allure de la courbe d'élimination de la substance d'essai (proprement dite ou à travers le COD) sur le processus d'élimination.

Adsorption

57. Si l'on observe une élimination élevée de la substance d'essai en termes de COD dès le début de l'essai, cette substance est probablement évacuée par adsorption sur les solides des boues activées. Il est possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée au moyen d'une analyse spécifique. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; normalement, le degré d'élimination est élevé au départ puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si toutefois la substance d'essai était de nature à acclimater la population de micro-organismes d'une façon ou d'une autre, l'élimination du COD de la substance d'essai augmenterait pour atteindre une valeur plateau élevée.

▼ **M4***Phase de latence*

58. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries qui dégradent s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai, ensuite elles commencent à croître. Cette phase s'achève et la phase de dégradation est censée débiter lorsque environ 10 pour cent de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (y compris par adsorption, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

59. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée par une quinzaine de valeurs mesurées valables.

Degré moyen d'élimination de la substance d'essai

60. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination (D_t) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 %), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 % de la valeur moyenne.

Élimination du milieu organique

61. Porter sur un graphique le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique dans l'unité témoin (D_B) en fonction du temps. Indiquer le degré d'élimination moyen comme pour la substance d'essai (paragraphe 60).

Indication de la biodégradation

62. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur les boues activées et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphe 58, 59), l'élimination mesurée est attribuable à coup sûr à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes, (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées ou effectuer des essais de biodégradation statiques supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais basés sur la consommation d'oxygène [chapitres C.4-D, E et F de la présente annexe (6)] ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone [chapitre C.4-C de la présente annexe (6)] ou de l'essai au CO_2 dans l'espace de tête de l'ISO (18), à conduire sur un inoculum préexposé provenant de l'essai de simulation. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives (le premier étant inférieur à la seconde) entre les pourcentages indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader que la substance parente.

Validité des résultats de l'essai

63. L'obtention d'informations sur l'activité de biodégradation normale de l'inoculum est subordonnée à la détermination du degré d'élimination du milieu organique (paragraphe 53) dans l'unité témoin. L'essai est considéré comme valable si le degré d'élimination du COD ou de la DCO dans la ou les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

▼ M4

64. Si on a utilisé une substance de référence immédiatement biodégradable, le degré de biodégradation (D_t , paragraphe 52) doit être supérieur à 90 pour cent.
65. Si l'essai est mené dans des conditions nitrifiantes, la concentration moyenne dans les effluents doit être < 1 mg/l d'azote ammoniacal et < 2 mg/l d'azote sous forme de nitrites.
66. Faute de remplir ces critères (paragraphe 63-65), recommencer l'essai en prélevant l'inoculum à une source différente, mettre une substance de référence à l'essai et réexaminer tout le mode opératoire.

Rapport d'essai

67. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nature chimique,
- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

- type de système d'essai; toute modification imposée par l'essai de substances insolubles et volatiles,
- type de milieu organique,
- proportion et nature des effluents industriels dans les eaux usées, s'ils sont connus,
- inoculum, nature et site(s) de prélèvement, concentration et prétraitement éventuel,
- solution mère de la substance d'essai: teneur en COD et en COT; mode de préparation, s'il s'agit d'une suspension; concentration d'essai appliquée; justifier pourquoi, le cas échéant, on s'écarte de l'intervalle 10 à 20 mg/l de COD; méthode d'addition; date de la première addition; toute modification,
- âge moyen des boues et temps de rétention hydraulique moyen; méthode d'épuisement des boues; méthodes pour vaincre le foisonnement, pertes de boue, etc.,
- techniques d'analyse employées,
- température d'essai,
- qualités du foisonnement des boues, indice des boues, matières en suspension de la liqueur mixte,
- tout écart du mode opératoire normal et toute circonstance susceptibles d'avoir affecté les résultats.

Résultats de l'essai:

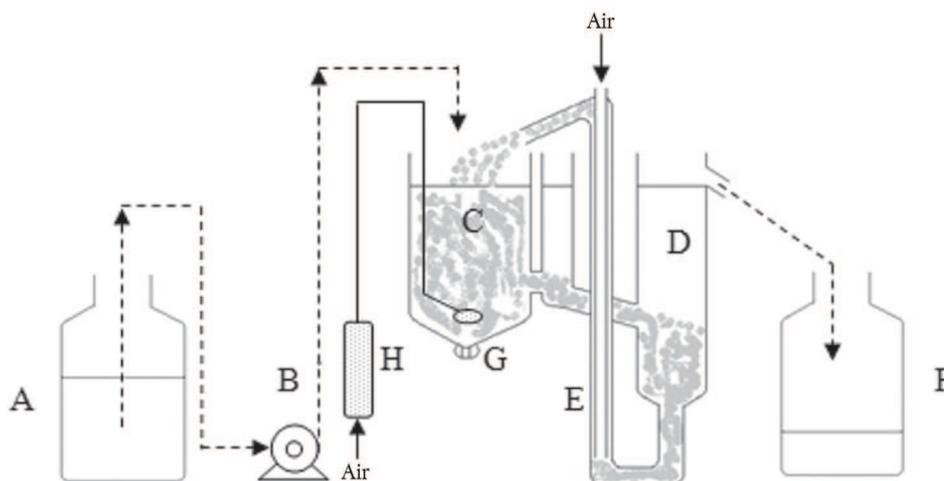
- toutes les données mesurées (COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, concentration d'oxygène, solides en suspension, substances azotées, le cas échéant),
- toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{10}), D_B , D_{St} présentées sous forme de tableau et de courbes d'élimination,
- informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai et du milieu organique dans l'unité témoin, données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,
- examen des résultats.

▼ **M4***BIBLIOGRAPHIE:*

- (1) Swisher R.D. (1987). «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1 085 pp.
- (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
- (3) Painter H.A. and King E.F. (1978a). WRC porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- (4) Painter H.A. and King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
- (5) Eckenfelder, W.W. (19) US EPA.
- (6) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».
- (7) Chapitre C.12 de la présente annexe, Biodégradation – Test S.C.A.S. modifié.
- (8) Chapitre C.19 de la présente annexe, Estimation du coefficient d'adsorption (K_{OC}) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie liquide haute performance (HPLC).
- (9) Gerike P. and Fischer W.K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
- (10) Gerike P. and Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
- (11) Painter H.A. and Bealing D. (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (12) ISO 11733 (1995; révision 2004). Détermination de l'élimination et de la biodégradabilité des composés organiques en milieu aqueux – Essai de simulation des boues activées.
- (13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
- (14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
- (15) Gerike P., Fischer W.K. and Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.
- (16) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
- (18) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO₂ dans l'espace de tête).

▼ **M4***Appendice 1**Figure 1***Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité**

Unité d'Husmann



A. Récipient de stockage

B. Pompe doseuse

C. Récipient d'aération (3 litres)

D. Décanteur

E. Émulseur à air

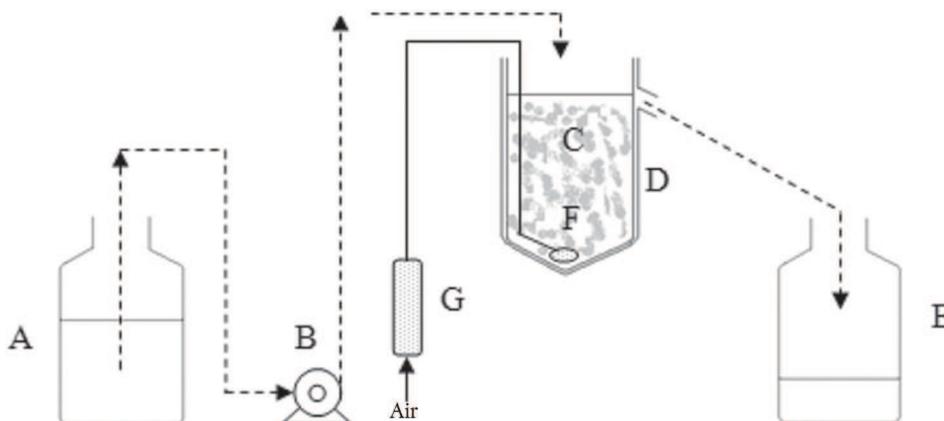
F. Collecteur

G. Cuve d'aération

H. Débitmètre d'air

*Figure 2***Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité**

Vase poreux



A. Récipient de stockage

B. Pompe doseuse

C. Vase d'aération poreux

D. Enveloppe imperméable

E. Collecteur

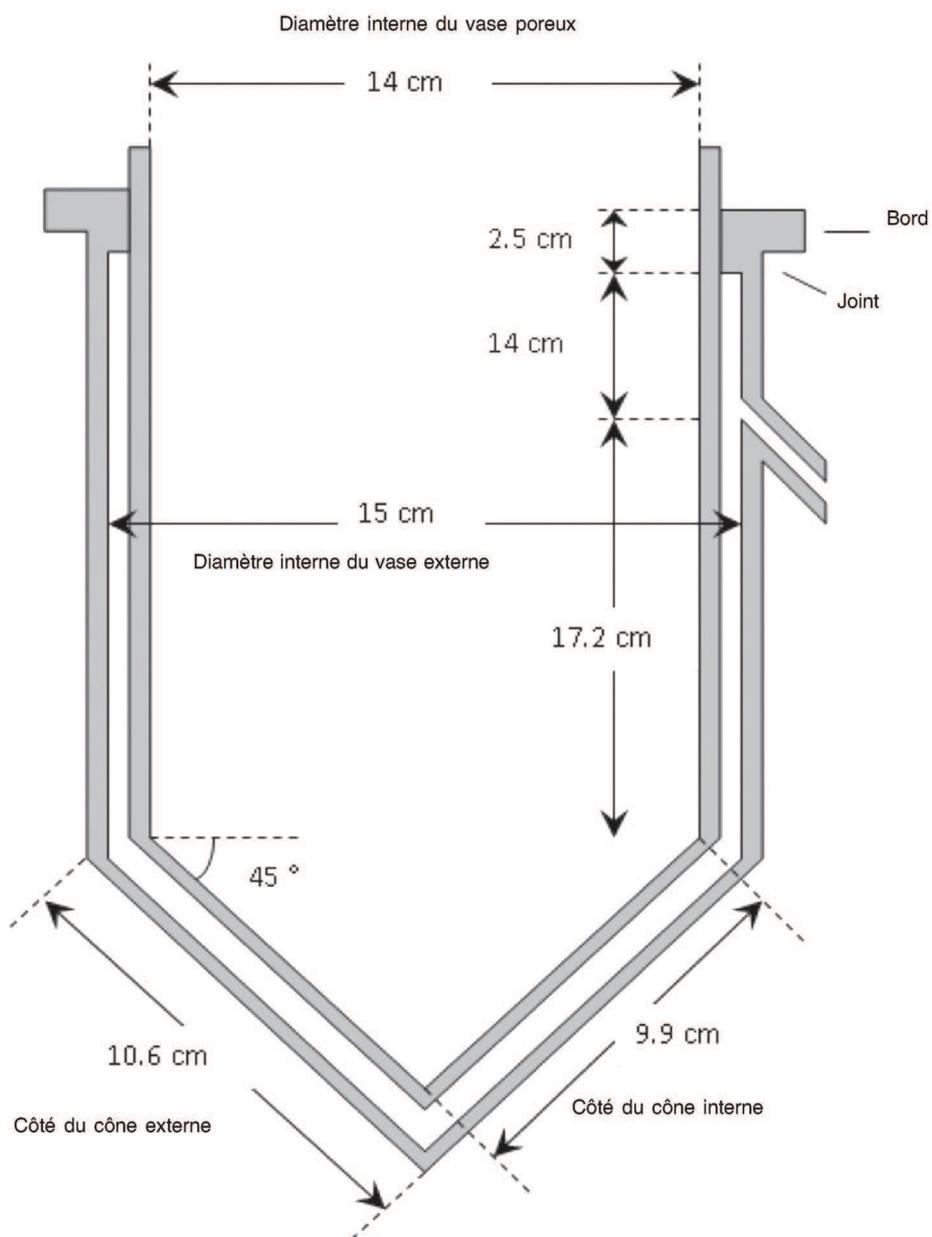
F. Diffuseur

G. Débitmètre d'air

▼ M4

Figure 3

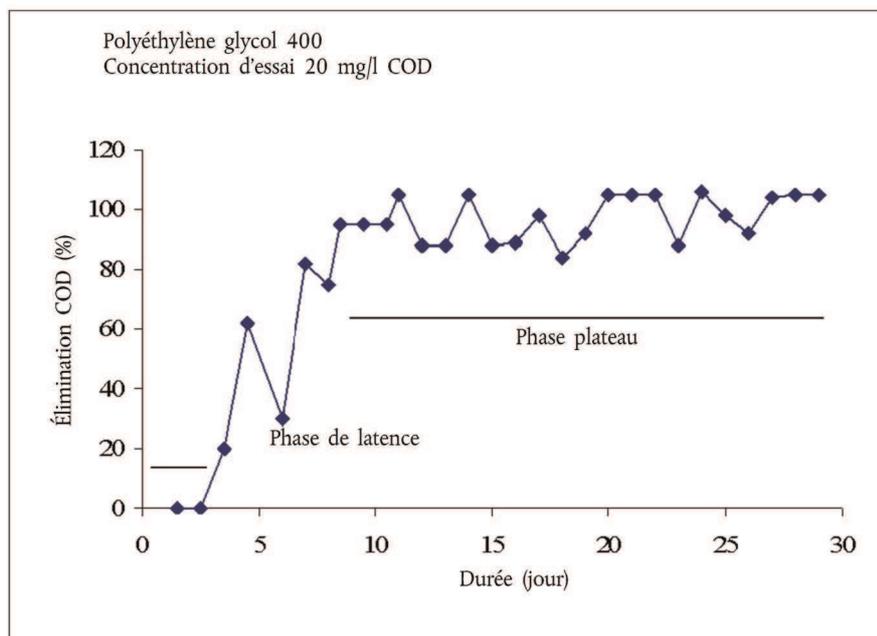
Agrandissement du vase d'aération poreux de 3 litres



▼ M4

Appendice 2

Exemple d'une courbe d'élimination



▼ **M4***Appendice 3*

COMPLÉMENT D'INFORMATION

COUPLAGE DES UNITÉS D'ESSAI

Pour tenter d'égaliser les populations de micro-organismes dans les boues de l'unité d'essai, qui reçoit les eaux usées et une substance d'essai, et de l'unité témoin, qui ne reçoit que les eaux usées, on a instauré un échange de boue quotidien entre ces deux unités (1). Ce procédé dit «de couplage» a donné lieu à la méthode des unités couplées. Le couplage, réalisé au départ sur des unités à boues activées de Husmann, a aussi été appliqué à des unités à vase poreux (2) (3). Les résultats obtenus avec les unités couplées et non couplées, qu'il s'agisse des unités d'Husmann ou des unités à vase poreux, ne donnent lieu à aucune différence significative, si bien qu'il n'y a aucun avantage à investir plus de temps et d'énergie dans le couplage.

Les échanges de boue peuvent laisser croire à une élimination assez considérable, puisqu'une partie de la substance d'essai est transférée et que l'écart entre la concentration de la substance d'essai dans les effluents d'essai et dans les effluents témoins se comble. Il faut donc appliquer des facteurs de correction qui dépendent de la fraction échangée et du temps de rétention hydraulique moyen. Une méthode de calcul plus détaillée a été publiée (1).

Calculer le degré d'élimination corrigé du COD ou de la DCO selon la formule générale suivante:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12) / (1 - a \cdot r/12) \%$$

où

D_{tc} = pourcentage d'élimination corrigé du COD ou de la DCO;

D_t = pourcentage d'élimination déterminé du COD ou de la DCO;

a = fraction volumique échangée entre les unités à boues activées;

r = temps de rétention hydraulique moyen (h)

Si, par exemple, la moitié du volume du récipient d'aération est échangée ($a = 0,5$) et que le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h, la formule de correction devient:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. *Wat. Res.* 9: 1131-1135.
- (2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: *Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18*. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.
- (3) Painter H.A., King E.F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼ **M4***Appendice 4*

ÉVALUATION DE L'INHIBITION DES BOUES ACTIVÉES

Inhibition par les substances d'essai

1. Il se peut qu'une substance chimique (ou des eaux usées) ne soient ni dégradées ni éliminées au cours de l'essai de simulation et qu'elles inhibent de surcroît les micro-organismes des boues. D'autres composés chimiques sont biodégradés à faible concentration, mais ont une action inhibitrice à des concentrations supérieures (hormèse). Les effets inhibiteurs peuvent avoir été révélés à un stade précédent ou être déterminés par un essai de toxicité, conduit sur un inoculum semblable ou identique à celui utilisé au cours de l'essai de simulation (1). Ces méthodes ont trait à l'inhibition de la fixation d'oxygène [chapitre C.11 de la présente annexe (2) et norme ISO 8192 (3)] ou à l'inhibition de la croissance des organismes des boues [norme ISO 15522 (4)].
2. Une inhibition survenant au cours d'un essai de simulation se manifestera par une différence de COD ou de DCO entre les effluents du récipient d'essai et ceux du récipient témoin supérieure au COD ajouté par la substance d'essai. En d'autres termes, la présence de la substance d'essai abaissera le pourcentage d'élimination du COD (et de la demande biochimique en oxygène DBO, de la demande chimique en oxygène DCO, et/ou de l'ion NH_4^+) du milieu organique traité. Si cela se produit, il faudrait recommencer l'essai en ramenant la concentration de la substance d'essai jusqu'à un niveau où elle n'est pas inhibitrice et éventuellement aussi en diminuant davantage sa concentration jusqu'à une valeur où elle est biodégradée. Néanmoins, si la substance d'essai (ou les eaux usées) altèrent le processus à toutes les concentrations testées, il est vraisemblable que la substance est difficile, voire impossible, à traiter par voie biologique, mais il peut être pertinent de répéter l'essai avec des boues activées prélevées à une autre source et/ou en soumettant les boues à une acclimatation plus progressive.
3. Par contre, si la substance d'essai est éliminée par voie biologique du premier coup dans l'essai de simulation, il convient d'accroître sa concentration si l'on cherche à savoir si elle a un pouvoir inhibiteur.
4. N'oublions pas, lorsqu'on tente de déterminer les degrés d'inhibition, que la population d'une boue activée est susceptible d'évoluer, si bien qu'avec le temps, les micro-organismes peuvent devenir résistants vis-à-vis d'une substance inhibitrice.
5. Calcul du degré d'inhibition:

Les pourcentages d'élimination globaux R_o de la DBO, du COD, de la DCO, etc., dans les unités d'essai et témoins peuvent être calculés comme suit:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

où:

I = concentration de la DBO, du COD, de la DCO etc., dans les eaux à traiter des récipients d'essai ou témoins (mg/l);

E = concentrations respectives dans les effluents (mg/l).

I et E doivent être corrigés pour tenir compte du COD provenant de la substance d'essai dans les unités d'essai, sinon le calcul du pourcentage d'inhibition sera incorrect.

▼ M4

Le degré d'inhibition découlant de la présence de la substance d'essai peut être calculé selon cette formule:

$$\%d'inhibition = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

où:

R_c = pourcentage d'élimination dans les récipients témoins;

R_t = pourcentage d'élimination dans les récipients d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Reynolds L. *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Chapitre C.11 de la présente annexe, Biodégradation – boues activées: essai d'inhibition de la respiration.
- (3) ISO 8192 (2007) 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.
- (4) ISO 15522 (1999) Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des micro-organismes de boues activées.

▼ M4*Appendice 5***Substances d'essai peu solubles dans l'eau – substances volatiles****Substances peu solubles dans l'eau**

Il semble qu'il y ait peu de publications rapportant des essais de simulation de traitement des eaux usées conduits sur des substances peu solubles dans l'eau et insolubles (1) (2) (3).

Il n'existe pas de méthode de dispersion universelle applicable à toutes les substances d'essai insolubles. Sur les quatre catégories de méthodes décrites dans la norme ISO 10634 (4), les deux qui paraissent convenir à la dispersion des substances destinées à un essai de simulation font appel à des agents émulsifiants et/ou à des ultrasons. La stabilité de la dispersion obtenue doit être établie pour une période d'au moins 24 heures. Des dispersions convenablement stabilisées contenues dans des réservoirs agités en permanence (paragraphe 38), seront ensuite dosées dans le récipient d'aération séparément des eaux usées domestiques ou synthétiques.

Si les dispersions sont stables, étudier comment déterminer la substance d'essai sous sa forme dispersée. Comme le COD risque fort d'être inapproprié, il faudrait mettre au point une méthode d'analyse spécifique de la substance d'essai applicable aux effluents, aux solides des effluents et à la boue activée. Le devenir de la substance d'essai dans la simulation du traitement par boues activées serait alors déterminé dans les phases solides et liquides. On établirait ainsi un bilan massique pour savoir si la substance d'essai a été biodégradée. Mais ce dernier n'indique que la biodégradation primaire. Il faudrait tâcher de démontrer la biodégradation finale par le biais d'un essai de biodégradabilité immédiate au respiromètre [chapitre C.4 de la présente annexe (5), C, F ou D] en utilisant comme inoculum une boue exposée à la substance d'essai au cours de l'essai de simulation.

Substances volatiles

L'application d'un essai de simulation du traitement des eaux usées aux substances volatiles est discutable et problématique. Comme pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, les rapports décrivant des essais de simulation sur des substances volatiles semblent très rares. On adapte un appareil classique de mélange intégral en bouchant hermétiquement le récipient d'aération et le décanteur, en mesurant et contrôlant le flux d'air par des débitmètres et en faisant passer les gaz sortants par des pièges afin de recueillir les matières organiques volatiles. Dans certains cas, une pompe à vide dirige les gaz sortants vers un piège froid ou un piège purgeur contenant du Tenax ou un gel de silice pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. La substance d'essai retenue par le piège peut être déterminée par analyse.

L'essai est réalisé en deux parties. Les unités fonctionnent d'abord sans boue, mais en pompant les eaux usées synthétiques additionnées de la substance d'essai dans le récipient d'aération. On analyse la substance d'essai dans des échantillons d'eaux à traiter, d'effluents et de gaz sortants pendant quelques jours. À partir des données recueillies, il est possible de calculer le pourcentage (R_{vs}) de substance d'essai extraite du système.

Ensuite l'essai biologique normal (avec boue) est mené dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'étude d'extraction. On mesure aussi le COD ou la DCO pour s'assurer que les unités fonctionnent efficacement. La substance d'essai est mesurée de temps à autre dans les eaux à traiter, les effluents et les gaz sortants au cours de la première partie de l'essai, et plus fréquemment après l'acclimatation. Les données tirées de la phase stationnaire permettent à nouveau de calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai dans la phase liquide par les processus physiques et biologiques (R_T) ainsi que la proportion (R_v) extraite du système.

▼ **M4**

Calcul:

- a) Dans l'essai non biologique, le pourcentage (R_{VP}) de substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

où

R_{VP} = élimination de la substance d'essai par volatilisation (%),

S_{VP} = substance d'essai collectée par le piège, exprimée en équivalent de concentration dans la phase liquide (mg/l),

S_{IP} = concentration de la substance d'essai dans les eaux à traiter (mg/l).

- b) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_V) de la substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

où

R_V = élimination de la substance d'essai par volatilisation au cours de l'essai biologique (%),

S_V = substance d'essai collectée par le piège au cours de l'essai biologique, exprimée en équivalent de concentration dans les flux liquides entrants (mg/l),

S_I = concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes (mg/l).

- c) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_T) de substance d'essai éliminée par tous les processus est régi par l'équation suivante:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

où

S_E = concentration de la substance d'essai dans les effluents (liquides) (mg/l).

- d) Aussi, le pourcentage (R_{BA}) enlevé par biodégradation et par adsorption peut-il être calculé comme suit:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Il conviendrait de réaliser d'autres essais pour déterminer si la substance d'essai est adsorbée, auquel cas une correction supplémentaire pourrait être apportée.

- e) Une comparaison entre la proportion de substance d'essai extraite lors de l'essai biologique (R_V) et de l'essai non biologique (R_{VP}) montre l'effet global du traitement biologique sur l'émission de la substance d'essai dans l'atmosphère.

Exemple: Benzène

Temps de rétention des boues = 4 jours

Eaux usées synthétiques: temps de rétention = 8 heures

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22,5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼ M4

Donc,

$R_{VP} = 100 \%$, $R_V = 15 \%$

$R_T = 100 \%$ and $R_{BA} = 85 \%$.

On a supposé qu'il n'y avait pas adsorption du benzène sur la boue.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Horn J.A., Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
- (5) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

▼ **M4***Appendice 6***Effets du temps de rétention des boues (TRB) sur les possibilités de traitement des substances chimiques**

INTRODUCTION

1. La méthode décrite dans le corps de texte a été conçue pour vérifier si les substances chimiques testées (généralement celles connues comme étant intrinsèquement, mais pas immédiatement biodégradables) pouvaient être biodégradées dans les limites imposées par les stations d'épuration des eaux usées. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination et de biodégradation. Les conditions de fonctionnement des unités à boues activées et le choix des eaux à traiter autorisent une variation assez marquée de la concentration de la substance d'essai dans les effluents. Les essais ne portent que sur une seule concentration nominale de solides des boues ou sur un seul temps de rétention nominal des boues (TRB), et les régimes d'épuisement des boues décrits sont susceptibles de faire varier considérablement le TRB durant l'essai, d'un jour à l'autre et sur une journée.
2. Dans cette variante (1) (2), le TRB est régulé dans des limites beaucoup plus étroites tout au long de chaque période de 24 heures (comme à grande échelle), si bien que la concentration des effluents est plus constante. On recommande les eaux usées domestiques, qui donnent des pourcentages d'élimination plus réguliers et plus élevés. Les effets de plusieurs valeurs du TRB sont aussi examinés et l'incidence d'une gamme de températures sur la concentration dans les effluents peut être déterminée dans une étude plus détaillée.
3. Il n'existe pas encore de consensus général sur les modèles cinétiques qui reproduisent la biodégradation des substances chimiques dans les conditions d'une station de traitement des eaux usées. S'agissant des données collectées, le modèle de croissance bactérienne et d'utilisation du substrat de Monod a été choisi (1) (2) dans la mesure où la méthode était destinée à ne s'appliquer qu'aux substances chimiques produites par tonnes et donc présentes à des concentrations supérieures à 1 mg/l dans les eaux usées. La validité du modèle simplifié et des hypothèses émises a été établie à l'aide d'une série d'alcooléthoxylates (2) (3) manifestant des degrés variables de biodégradabilité primaire.

Note: cette variante reprend en grande partie le texte de la présente méthode d'essai C.10-A, seuls les détails qui s'en écartent étant mentionnés ci-après.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Des unités à boues activées comportant un vase poreux, conçues pour faciliter l'épuisement (presque) continu de la liqueur mixte grâce à un réglage très précis du temps de rétention des boues (TRB, ou θ_s), fonctionnent en mode non couplé et couvrent une gamme de temps de rétention et, facultativement, de températures. Le temps de rétention varie généralement entre 2 et 10 jours et la température entre 5 et 20 °C. Les eaux usées, de préférence domestiques, et une solution de la substance d'essai sont dosées séparément dans les unités à des fréquences induisant le temps de rétention des eaux usées requis (3 à 6 heures) et la concentration voulue de la substance d'essai dans les eaux à traiter. Les unités témoins qui ne reçoivent pas la substance d'essai tournent en parallèle, à des fins de comparaison.
5. D'autres types d'appareils peuvent être utilisés, mais il faut être très attentif à bien maîtriser le TRB. Lorsqu'on utilise, par exemple, des installations qui comprennent un décanteur, il peut être nécessaire de tenir compte de la perte de solides via les effluents de l'installation. En outre, les erreurs dues à la variation de la quantité de boue dans le décanteur doivent être évitées par des précautions particulières.

▼M4

6. Les unités fonctionnent sous chaque combinaison de conditions choisie et, une fois l'équilibre atteint, on mesure les concentrations moyennes de la substance d'essai dans les effluents à l'état stationnaire et, facultativement, le COD, sur une période d'environ trois semaines. L'évaluation du pourcentage d'élimination de la substance d'essai et, facultativement, du COD, sera complétée par une représentation graphique de la relation entre les conditions de fonctionnement de l'installation et la concentration dans les effluents. À partir de là, il est possible de calculer des constantes cinétiques expérimentales et de prévoir les conditions dans lesquelles la substance d'essai peut être traitée.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Appliquer les paragraphes 12 et 13 du chapitre C.10-A.

NIVEAUX DE SEUILS

8. Appliquer les paragraphes 14 et 15 du chapitre C.10-A.

SUBSTANCE D'ESSAI DE RÉFÉRENCE

9. Appliquer le paragraphe 16 du chapitre C.10-A.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

10. Appliquer les paragraphes 17 et 18 du chapitre C.10-A.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

11. Une unité qui convient ici est une adaptation du système du vase poreux (appendice 6.1). Elle consiste en un vase interne (ou revêtement) en polypropylène poreux de 3,2 mm d'épaisseur dont les pores mesurent environ 90 µm; l'assemblage est soudé bout à bout, ce qui rend l'unité plus robuste que celle décrite au paragraphe 21 du présent chapitre, C.10-A). Le revêtement est entouré d'une enveloppe en polyéthylène imperméable qui comprend deux parties: une base circulaire perforée pour laisser passer deux tuyaux à air et un tuyau transportant la boue épuisée, et un cylindre vissé sur le dessus de la base et doté d'une sortie placée de manière à ce qu'il déverse un volume connu (3 l) dans le vase poreux. L'un des deux tuyaux à air est équipé d'une pierre diffuseuse et l'autre est ouvert aux extrémités et disposé à angle droit de la pierre dans le vase. Ce système crée suffisamment de turbulences pour assurer un mélange intégral des composants du vase et engendrer des concentrations en oxygène dissous supérieures à 2 mg/l.
12. Les unités, en nombre adéquat, sont placées dans un bain-marie ou dans des locaux à température constante et thermostatés entre 5 et 20 °C (± 1 °C). On emploie deux pompes pour doser la solution de la substance d'essai et les boues décantées dans les récipients d'aération aux débits requis (respectivement 0-1,0 ml/min et 0-25 ml/min) et une troisième pompe pour évacuer la boue épuisée des récipients d'aération. Le débit nécessairement très lent des boues épuisées est imprimé par une pompe qui fonctionne à une vitesse supérieure et par intermittences, au moyen d'un minuteur qui l'actionne, par exemple, pendant 10 secondes par minute avec un débit de 3 ml/min, ce qui donne un débit de boue épuisée de 0,5 ml/min.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

13. Appliquer le paragraphe 23 du chapitre C10-A.

Matériel d'analyse

14. Appliquer le paragraphe 24 du chapitre C.10-A.

Eau

▼ **M4**

15. Appliquer les paragraphes 25 et 26 du chapitre C.10-A.

Milieu organique

16. Appliquer le paragraphe 27 du chapitre C.10-A.

Eaux usées synthétiques

17. Appliquer le paragraphe 28 du chapitre C.10-A.

Eaux usées domestiques

18. Appliquer le paragraphe 29 du chapitre C.10-A.

Boues activées

19. Appliquer le paragraphe 30 du chapitre C.10-A.

Solutions mères de la substance d'essai

20. Appliquer les paragraphes 31 et 32 du chapitre C.10-A.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de l'inoculum

21. Voir chapitre C.10-A, paragraphe 34 uniquement – utiliser des boues activées (environ 2,5 g/l).

Nombre d'unités d'essai

22. S'agissant d'un essai simple, qui ne vise qu'à mesurer le pourcentage d'élimination, un seul TRB suffit, mais si on veut réunir les données nécessaires pour calculer les constantes cinétiques expérimentales, on aura besoin de 4 ou 5 valeurs de TRB. Les valeurs choisies sont généralement comprises entre 2 et 10 jours. Il est plus pratique de réaliser un essai en appliquant 4 ou 5 valeurs de TRB simultanément à la même température; les études plus poussées portent sur les mêmes valeurs de TRB, ou éventuellement sur une gamme de valeurs différentes, à d'autres températures fixées entre 5 et 20 °C. La biodégradation primaire (utilisation principale) ne requiert normalement qu'une seule unité par combinaison de conditions. Il faut ajouter une unité témoin par combinaison de conditions, qui reçoit les eaux usées mais pas la substance d'essai, pour la biodégradation finale. Si on suppose que les eaux usées employées renferment la substance d'essai, il y a lieu d'incorporer des unités témoins lorsqu'on évalue la biodégradation primaire, et d'apporter les corrections nécessaires aux calculs.

Dosage du milieu organique et de la substance d'essai

23. Voir le chapitre C.10-A, paragraphes 36 à 39, mais remarquer que la solution de la substance d'essai est dosée séparément et différents débits de boues épuisées sont appliqués. Surveiller fréquemment, par exemple deux fois par jour et ajuster si nécessaire à ± 10 pour cent, les débits des eaux à traiter, des effluents et des boues épuisées. Si les méthodes d'analyse posent des difficultés avec les eaux usées domestiques, mener l'essai avec de l'eau usée synthétique, en s'assurant que différents milieux donnent des résultats cinétiques comparables.

Manipulation des boues activées

24. S'aligner sur le chapitre C.10-A, paragraphes 40 à 43, mais ne réguler le TRB que par un débit «constant» de boues épuisées.

Échantillonnage et analyse

25. Se référer au chapitre C.10-A, paragraphes 44 à 50, à cette exception près qu'on déterminera la concentration de la substance d'essai et, facultativement, le COD, mais la DOC ne doit pas être utilisée.

▼ **M4****RÉSULTATS ET RAPPORT****Traitement des résultats**

26. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 52 à 54.

Expression des résultats de l'essai

27. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 56 à 62.

Calcul des constantes cinétiques

28. Il est plus réaliste de mentionner la concentration moyenne de la substance d'essai à l'état stationnaire dans l'effluent et de décrire comment elle varie en fonction des conditions de fonctionnement de l'installation que de citer le pourcentage de biodégradation primaire. L'équation [6] de l'appendice 6.2 est utile à cet égard, qui livre des valeurs de K_S , μ_m et θ_{SC} , le temps de rétention critique des boues.

[Des valeurs approximatives de K_S et de μ_m peuvent aussi être déduites à l'aide d'un programme informatique simple qui ajuste la courbe théorique calculée à partir de l'équation [2] (appendice 6.2) aux valeurs expérimentales. Bien qu'une solution donnée ne constitue pas une réponse absolue, on peut parvenir à une approximation raisonnable de K_S et de μ_m].

Variabilité des résultats

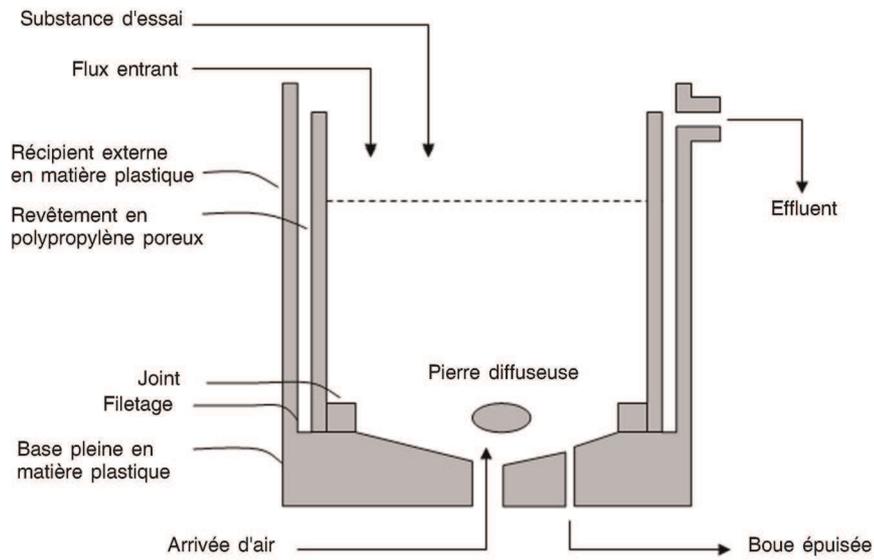
29. Il est fréquent de trouver des paramètres cinétiques variables pour une même substance. On pense que les conditions de croissance des boues et les conditions dans lesquelles s'est déroulé l'essai (comme au paragraphe 5 et dans d'autres essais) ont une incidence marquée sur les résultats. Un aspect de cette variabilité a été examiné par Grady *et al.* (4), qui ont proposé que les termes «effectif» et «intrinsèque» s'appliquent à deux états extrêmes représentant les limites de l'état physiologique qu'une culture peut atteindre au cours d'une expérience cinétique. Si l'état est maintenu durant l'essai, les valeurs du paramètre cinétique reflètent les conditions du milieu dans lequel les micro-organismes ont été prélevés; ces valeurs sont dites «effectives». À l'autre extrême, si les conditions de l'essai autorisent le plein développement du système de synthèse des protéines et donc un taux de croissance maximum, les paramètres cinétiques résultants sont dits «intrinsèques» et ne dépendent que de la nature du substrat et des types de bactéries qui composent la culture. À titre indicatif, on obtiendra des valeurs effectives en appliquant un rapport de la concentration du substrat sur les micro-organismes qui dégradent (S_0/X_0) faible, par exemple de 0,025, et les valeurs intrinsèques apparaîtront avec un rapport élevé, par exemple d'au moins 20. Dans les deux cas, S_0 doit être supérieur ou égal à la valeur applicable de K_S , la constante de demi-saturation.
30. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (5). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornada Com. Espanol Deterg.: 33-48.
- (2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. JAOCS, 61(2): 340-343.
- (3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼ **M4**

- (4) Grady C.P.L., Smets B.F. and Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res.*, 30 (3): 742-748.
- (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼ **M4***Appendice 6.1***Vase poreux avec régulation du TRB**

▼ **M4***Appendice 6.2***Calcul des constantes cinétiques**

1. En supposant que la cinétique de Monod s'applique et compte tenu d'un bilan massique de solides actifs et de substrat dans le système à boues activées (1), les expressions suivantes décrivent l'état stationnaire:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

Où:

S_1 = concentration de substrat dans les effluents (mg/l)

K_S = constante de demi-saturation, concentration à laquelle $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = taux de croissance spécifique (d^{-1})

μ_m = valeur maximale de μ_m (d^{-1})

K_d = vitesse de dégradation spécifique des solides actifs (d^{-1})

θ_s = temps de rétention moyen des boues, TRB (d)

L'étude de cette équation amène les conclusions suivantes:

- i) La concentration dans les effluents est indépendante de celle qui règne dans les eaux à traiter (S_0); aussi, le pourcentage de biodégradation varie-t-il avec la concentration dans les eaux à traiter, S_0 .
- ii) Le seul paramètre réglé de l'installation qui affecte S_1 est le temps de rétention des boues, θ_s .
- iii) Une concentration donnée dans les eaux à traiter, S_0 , correspondra à un temps de rétention critique des boues selon la relation:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

Où:

θ_{SC} = temps de rétention critique des boues, en dessous duquel les micro-organismes qui dégradent seront expulsés de l'installation.

- iv) Comme les autres paramètres de l'équation [2] sont liés à la cinétique de croissance, la température est susceptible d'affecter la teneur en substrat dans les effluents et l'âge critique des boues, en d'autres termes, le temps de rétention des boues nécessaire pour obtenir un certain degré de traitement augmenterait à mesure que la température diminuerait.
2. Soit un bilan massique de solides dans le système à vase poreux, et en supposant que la concentration des solides dans les effluents de la station, X_2 , est faible comparée à celle du récipient d'aération, X_1 , le temps de rétention des boues s'exprime comme suit:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

▼ **M4**

et

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

où:

V = volume du récipient d'aération (l)

X₁ = concentration des solides dans le récipient d'aération (mg/l)

X₂ = concentration des solides dans l'effluent (mg/l)

Q₀ = débit des eaux à traiter (l/d)

Q₁ = débit des boues épuisées (l/d)

Il est donc possible de régler le temps de rétention des boues sur n'importe quelle valeur présélectionnée en régulant le débit des boues épuisées, Q₁.

Conclusions:

3. Cet essai vise principalement à permettre de prédire la concentration dans les effluents et, à partir de là, la concentration de la substance d'essai dans les eaux réceptrices.
4. La courbe de S₁ en fonction de θ_S autorise parfois une évaluation immédiate du temps de rétention critique des boues, θ_{SC}; voir par exemple la courbe 3 à la figure 1. Si c'est impossible, on peut calculer θ_{SC} en même temps que des valeurs approximatives de μ_m et K_S, en traçant S₁ en fonction de S₁•θ_S.

L'équation [1] est reformulée en ces termes:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Si K_d est petit, alors 1 + θ_s • K_d ~ 1 et [5] devient:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Par la suite, la courbe devrait prendre l'allure d'une droite (voir figure 2) de pente 1/μ_m et intercepter K_S/μ_m; et θ_S ~ 1/μ_m.

▼ M4

Figure 1

Trois températures; cinq TRB

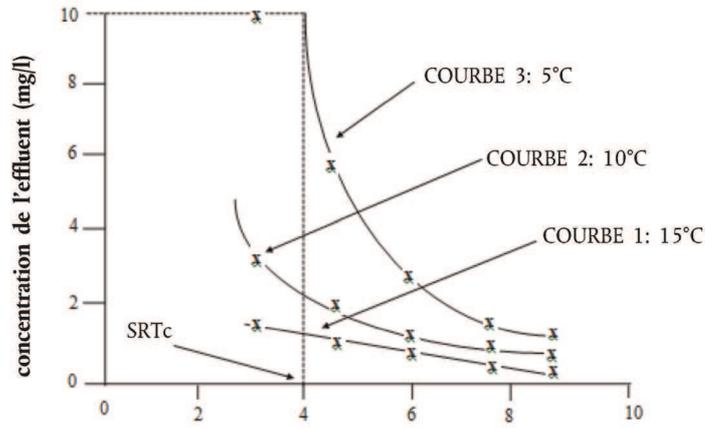
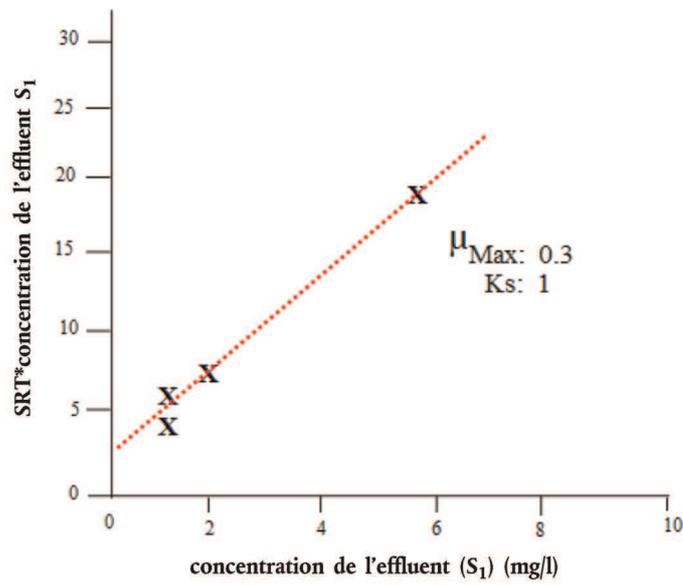


Figure 2

Droite de régression TRB · S₁ en fonction de S₁ à T = 5 °C



Glossaire

concentration de l'effluent.

courbe.

▼ **M4***Appendice 7***ESSAIS RÉALISÉS À FAIBLES CONCENTRATIONS ($\mu\text{G/L}$)**

1. De nombreuses substances chimiques sont normalement présentes dans le milieu aquatique, même dans les eaux usées, à de très faibles concentrations ($\mu\text{g/l}$). À de telles teneurs, elles ne servent probablement pas de substrats primaires pour la croissance, et il est plus vraisemblable qu'elles subissent une dégradation en tant que substrats secondaires sans intervenir dans la croissance, parallèlement à diverses substances chimiques carbonées naturelles. Par conséquent, les dégradations de ces substances chimiques ne correspondront pas au modèle décrit à l'appendice 6. De nombreux modèles pourraient les représenter et, dans les conditions qui régissent les systèmes de traitement des eaux usées, celles-ci peuvent probablement se refléter simultanément dans plusieurs modèles. Il faudra entreprendre des recherches bien plus poussées pour élucider ce problème.
2. En attendant, le mode opératoire exposé dans le corps de texte (chapitre C.10-A) peut être suivi, mais il ne s'applique qu'à la biodégradabilité primaire, à des concentrations suffisamment basses ($< 100 \mu\text{g/l}$), et requiert une méthode d'analyse validée. Le pourcentage de biodégradation peut être calculé (voir au paragraphe 54 de la présente méthode d'essai), mais à condition de tenir compte des processus non biologiques (adsorption, volatilité, etc.). L'étude conduite par Nyholm et son équipe (1) (2) sur un cycle de quatre heures dans un système à lit de contact en est un exemple. Ils ont opposé des pseudo-constantes de premier ordre pour cinq substances chimiques ajoutées à des eaux usées synthétiques à raison de 5 à 100 $\mu\text{g/l}$ (s'agissant de la biodégradabilité finale, des substances d'essai marquées au ^{14}C peuvent être utilisées). La description d'un procédé n'entre pas dans le cadre de la présente méthode d'essai dans la mesure où aucun ne fait encore l'unanimité, bien qu'une méthode proposée pour la norme ISO 14592 (3) contienne des indications concernant l'emploi de substances marquées au ^{14}C .

Essai de biodégradation en semi-continu à l'aide de boues activées

3. Un essai plus simple en deux étapes a été présenté ultérieurement (4) (5) (6); la méthode en semi-continu à l'aide de boues activées (SCBA) est suivie par des essais cinétiques à court terme pratiqués sur des échantillons prélevés dans les unités SCBA. Les débits de boues épuisées sont connus dans le système SCBA (contrairement à la méthode d'essai originale C.12), qui est alimenté par des eaux usées synthétiques (formule de l'OCDE modifiée) ou par des eaux usées domestiques. Les eaux usées synthétiques ont été modifiées (à cause de la fluctuation du pH et de la mauvaise décantabilité des boues) par addition d'un tampon phosphate, d'un extrait de levure, de chlorure de fer (III) et de sels d'oligo-éléments, et leur DCO a été relevée jusqu'à environ 750 mg/l moyennant une augmentation de la concentration de peptone et d'extrait de viande. Les unités tournaient en cycles de 24 heures: aération pendant 23 heures, épuisement des boues, décantation, enlèvement du surnageant (effluent), suivis par l'adjonction des eaux usées synthétiques et de la substance d'essai jusqu'à 100 $\mu\text{g/l}$ (c'est-à-dire à peu près la même concentration que celle appliquée dans l'essai à court terme). Une fois par semaine, on remplace 10 pour cent de la totalité des boues par des boues fraîches, afin de maintenir l'équilibre de la population de micro-organismes.
4. Les concentrations de la substance d'essai sont mesurées au début et à la fin de l'aération, et l'essai est poursuivi jusqu'à ce que l'élimination de la substance d'essai devienne constante, ce qui peut prendre une semaine à plusieurs mois.

Essai à court terme

5. Pratiquer un essai à court terme (8 heures, par exemple), afin de déterminer la pseudo-constante cinétique de premier ordre relative à la dégradation de la substance d'essai dans des boues activées ayant des origines et des évolutions différentes, mais connues. En particulier, prélever des échantillons de boues des réacteurs SCBA – à la fin d'une période d'aération lorsque la concentration de substrat organique est basse – au cours d'un essai d'acclimatation (paragraphe 3, 4). On peut aussi prélever des boues d'une unité

▼M4

SCBA tournant en parallèle et non exposée à la substance d'essai, pour comparaison. Aérer des mélanges de boue et de substance d'essai incorporée à deux ou plusieurs concentrations comprises entre 1 et 50 µg/l, sans ajouter d'eaux usées synthétiques ni d'autre substrat organique. La substance d'essai restant en solution est mesurée à intervalles réguliers, par exemple toutes les heures, suivant la dégradabilité de la substance, durant une période qui n'excède pas 24 heures. Centrifuger les échantillons avant de les soumettre à une analyse appropriée..

Calculs

6. Les données provenant des unités SCBA servent à calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai (paragraphe 54). Une constante de vitesse moyenne, K_1 (établie en fonction de la concentration des solides en suspension), peut aussi être calculée à partir de la formule suivante:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

Où:

t = durée d'aération (23 h)

C_e = concentration à la fin de la période d'aération (µg/l)

C_i = concentration au début de l'aération (µg/l)

SS = concentration des solides des boues activées (g/l)

7. Dans l'essai à court terme, tracer la courbe du logarithme de la concentration (%) restante en fonction du temps; la pente de la partie initiale (10-50 pour cent de dégradation) de la courbe est équivalente à K_1 , la pseudo-constante de premier ordre. Établir la constante en fonction de la concentration des solides des boues en divisant la pente par la concentration de ces solides. Le résultat indiqué doit préciser les concentrations initiales de la substance d'essai et des solides en suspension, le temps de rétention des boues, la charge et la source des boues ainsi que, le cas échéant, la préexposition à la substance d'essai.

Variabilité des résultats

8. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (7). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. and Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability. Wat. Res.* 26: 339-353.
- (2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., and Ostfeldt P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res.* 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼ M4

- (4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. and Frimer-Larsen H. (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and $\mu\text{g/l}$ range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg U.T. and Nyholm N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low ($\mu\text{g/l}$ range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, S.G. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼ **M4****C.10-B: Biofilms**

INTRODUCTION

1. Les essais de simulation s'appliquent normalement aux substances chimiques qui ont donné un résultat négatif à l'essai de biodégradabilité immédiate [chapitre C.4-A à F de la présente annexe (9)], mais un résultat positif à l'essai de biodégradabilité intrinsèque. Exceptionnellement, les essais de simulation se pratiquent aussi en vue d'obtenir des informations supplémentaires sur une substance d'essai, en particulier les substances chimiques produites en grandes quantités, et l'on recourt normalement à l'essai de traitement par boues activées (C.10-A). Toutefois, dans certaines circonstances, il y a lieu de connaître certaines données particulières concernant la réaction d'une substance chimique à des méthodes de traitement des eaux usées comportant des biofilms, à savoir des lits à ruissellement ou lits bactériens, des disques biologiques et des lits fluidisés. Différents dispositifs ont été créés à cette fin.
2. Gerike *et al.* (1) ont utilisé de grands lits bactériens en mode couplé à l'échelle pilote. Ces lits occupaient beaucoup d'espace et exigeaient des volumes relativement élevés d'eaux usées domestiques ou synthétiques. Truesdale *et al.* (2) ont décrit des lits plus petits (1,83 m × 0,15 m de diamètre) alimentés par des eaux usées naturelles dépourvues de tensioactifs, mais qui demandaient encore des volumes assez importants. Il ne fallait pas moins de 14 semaines pour qu'un biofilm arrive à «maturité» et 4 à 8 semaines supplémentaires après la première introduction du tensioactif d'essai pour l'acclimatation.
3. Baumann *et al.* (3) ont mis au point un lit beaucoup plus petit à base de polyester «velu» préalablement plongé dans des boues activées, servant de substrat inerte pour le biofilm. La substance d'essai constituait la seule source de carbone et la biodégradabilité était évaluée d'après la mesure du carbone organique dissous (COD) dans les eaux à traiter et les effluents, et la quantité de CO₂ dans les dégagements gazeux.
4. Une approche assez différente a été tentée par Gloyna *et al.* (4), qui ont inventé le réacteur tubulaire rotatif. Ils ont cultivé un biofilm sur la surface interne d'un tube rotatif, sur la superficie connue, en y faisant passer des eaux à traiter qu'ils déversaient au sommet du tube légèrement incliné par rapport à l'horizontale. Le réacteur a servi à étudier la biodégradabilité des tensioactifs (5) ainsi que l'épaisseur optimale du biofilm et la diffusion à travers le film (6). Ces auteurs ont perfectionné le réacteur, notamment pour pouvoir déterminer le CO₂ dans les dégagements gazeux.
5. Le réacteur tubulaire rotatif a été adopté par le Standing Committee of Analysts (Royaume-Uni) comme méthode de référence pour évaluer la biodégradabilité des substances chimiques (7) ainsi que les possibilités de traitement des eaux usées et leur toxicité (8). La méthode décrite ici est simple, concise et reproductible et, de surcroît, ne nécessite que des volumes relativement petits de milieu organique.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des eaux usées synthétiques ou domestiques et la substance d'essai sont appliquées, séparément ou incorporées, sur la surface interne d'un tube incliné en rotation lente. Une couche de micro-organismes, semblables à ceux présents dans le milieu du biofiltre, se développe sur la surface interne. Le fonctionnement du réacteur est régulé de telle sorte qu'il entraîne une élimination adéquate de la matière organique et, si nécessaire, l'oxydation de l'ammonium.

▼ **M4**

7. Les effluents du tube sont collectés et décantés et/ou filtrés avant l'analyse du carbone organique dissous (COD) et/ou de la substance d'essai par une méthode spécifique. Les unités témoins, qui ne reçoivent pas la substance d'essai, tournent en parallèle dans les mêmes conditions, à des fins de comparaison. La différence entre les concentrations de COD dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est imputée par hypothèse à la substance d'essai et à ses métabolites organiques. On compare cette différence à la concentration de la substance d'essai ajoutée (en termes de COD) pour calculer l'élimination de la substance d'essai.
8. Il est normalement possible de distinguer la biodégradation de la bioadsorption par un examen attentif de la courbe d'élimination en fonction du temps. L'observation peut généralement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate (consommation d'oxygène ou production de dioxyde de carbone) réalisé à l'aide d'un inoculum acclimaté prélevé à la fin de l'essai dans les réacteurs qui reçoivent la substance d'essai.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

9. La pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai doivent être connues pour que l'interprétation des résultats soit correcte.
10. Normalement, les substances chimiques volatiles et peu solubles ne peuvent être mises à l'essai sans précautions particulières (voir appendice 5 du chapitre C.10-A). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO) et le carbone organique dissous (COD).
11. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4 du chapitre C.10-A) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

12. À l'origine, la mise sur le marché des tensioactifs était subordonnée à un taux de biodégradation primaire supérieur ou égal à 80 pour cent. Faute d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

13. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances chimiques dont le comportement est connu. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du 1-naphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

14. L'écart-type obtenu par un laboratoire britannique s'élevait à 3,5 % au moment des essais et à 5 % entre les essais (7).

▼ **M4**

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils*Réacteurs tubulaires rotatifs*

15. L'appareil (voir figures 1 et 2 de l'appendice 8) consiste en une batterie de tubes en acrylique de 30,5 cm de long et 5 cm de diamètre interne, supportés par des roulettes entourées de caoutchouc, fixées sur un cadre métallique. Chaque tube s'accroche aux roulettes par un bourrelet extérieur de 0,5 cm d'épaisseur environ, et possède un bourrelet interne de la même épaisseur à l'extrémité supérieure (d'alimentation) pour retenir le liquide; la surface interne a été rendue rugueuse par un tampon de laine à poils épais. Les tubes sont inclinés à un angle d'environ un degré par rapport à l'horizontale pour que le milieu d'essai appliqué sur un tube propre reste en contact avec celui-ci le temps nécessaire. Les roulettes revêtues de caoutchouc sont actionnées par un moteur lent à vitesse variable. La température des tubes est régie par leur installation dans un local à température constante.
16. En enfermant chaque réacteur tubulaire dans un tube légèrement plus grand et fermé par un capuchon en veillant à ce que les connexions soient étanches aux gaz, on peut collecter les dégagements de CO₂ dans une solution alcaline en vue de mesures ultérieures (6).
17. Chaque tube est alimenté en milieu organique et en substance d'essai, le cas échéant, par un réservoir de 20 litres (A) (voir figure 2) pour une période de 24 heures. Si nécessaire, la solution de la substance d'essai peut être dosée séparément. Il existe un orifice de sortie situé près du fond de chaque réservoir connecté par un tuyau fait d'une matière appropriée, par exemple du caoutchouc de silicone, via une pompe péristaltique (B) à un tube en verre ou en acrylique qui s'enfonce sur 2 à 4 cm à l'intérieur de l'extrémité supérieure (d'alimentation) du tube incliné (C). L'effluent s'égoutte ainsi de l'extrémité inférieure du tube incliné dans un autre récipient de stockage (D). L'effluent est décanté ou filtré avant analyse.

Appareil de filtration – centrifugeuse

18. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominale de 0,45 µm) qui adsorbe les composés organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s² peut remplacer l'appareil de filtration.
19. Matériel d'analyse permettant de déterminer:
 - le rapport carbone organique dissous (COD)/carbone organique total (COT), ou la demande chimique en oxygène (DCO),
 - la substance chimique donnée (CLHP, CG, etc.) s'il y a lieu,
 - le pH, la température, l'acidité, l'alcalinité,
 - l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si les essais sont réalisés dans des conditions nitrifiantes.

Eau

20. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD.
21. Eau distillée ou désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

▼ **M4***Milieu organique*

22. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Comme il a été démontré que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD (dans les unités à boues activées) et entraînaient même la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE, on préconise l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO dans chaque nouveau lot de milieu organique. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou hydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ $7,5 \pm 0,5$ dans le réacteur durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas.

Eaux usées synthétiques

23. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. On utilisera en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Ces eaux usées synthétiques peuvent être confectionnées à base d'eau distillée, sous une forme concentrée, et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un supplément de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

24. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux à traiter de la station de traitement par boues activées et renfermer très peu de grosses particules. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'a pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Lubrifiant

25. Les roulettes de la pompe péristaltique peuvent être lubrifiées avec du glycérol ou de l'huile d'olive: les deux conviennent aux tubes en caoutchouc de silicone.

Solutions mères de la substance d'essai

26. Pour les substances chimiques présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances chimiques insolubles, se reporter à l'appendice 5 du chapitre C.10-A. La présente méthode n'est pas applicable aux substances chimiques volatiles sans modification préalable des réacteurs tubulaires (paragraphe 16). Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique

▼ **M4**

dans la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle dépasse normalement 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est praticable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

27. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à pH $7 \pm 0,5$ avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation du milieu organique à doser

28. Nettoyer à fond les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci.
29. Utiliser des eaux usées synthétiques (paragraphe 23) préparées le jour même, en diluant dans les proportions requises les solides ou la solution mère concentrée avec de l'eau du robinet. La quantité nécessaire est mesurée dans un cylindre et versée dans un récipient propre destiné à recevoir les eaux à traiter. S'il y a lieu, ajouter la quantité voulue de solution mère de la substance d'essai ou de substance de référence aux eaux usées synthétiques avant la dilution. Si cela est plus approprié, ou nécessaire afin d'éviter des pertes de substance d'essai, préparer à part une solution diluée de la substance d'essai dans un autre récipient et répartir cette dernière dans les tubes inclinés au moyen d'une autre pompe doseuse.
30. En alternance (et de préférence), utiliser des eaux usées domestiques décan-tées (paragraphe 24) récoltées le jour même si possible.

Fonctionnement des réacteurs tubulaires rotatifs

31. L'évaluation de la substance d'essai demande deux réacteurs tubulaires identiques assemblés dans un local à température constante, normalement à 22 ± 2 °C.
32. Ajuster les pompes péristaltiques de façon à répartir 250 ± 25 ml/h de milieu organique (sans substance d'essai) dans les tubes inclinés, qui tournent à 18 ± 2 tr/min. Lubrifier (paragraphe 25) les tuyaux de la pompe au début de l'essai et régulièrement au cours de celui-ci afin de lui assurer un bon fonctionnement et de prolonger la vie des tuyaux.
33. Régler l'angle d'inclinaison des tubes par rapport à l'horizontale de façon à produire un temps de séjour de l'eau d'alimentation de $125 \pm 12,5$ secondes dans un tube propre. Estimer le temps de rétention en ajoutant un marqueur non biologique (par exemple: NaCl, un colorant inerte) à l'eau d'alimentation: le temps requis pour atteindre la concentration maximale dans l'effluent est censé être le temps de rétention moyen (quand le développement du film est à son maximum, le temps de rétention peut s'accroître jusqu'à environ 30 minutes).
34. On a constaté que ces débits, vitesses et temps donnaient des pourcentages d'élimination adéquats (supérieurs à 80 pour cent) de COD (ou DCO) et engendraient des effluents nitrifiés. Le débit doit être modifié si l'élimination est insuffisante ou s'il y a lieu de simuler le fonctionnement d'une station d'épuration donnée. Dans ce cas, ajuster le débit de dose du milieu organique jusqu'à ce que le fonctionnement du réacteur s'aligne sur celui de la station d'épuration.

▼ M4*Inoculation*

35. L'inoculation par exposition à l'air peut suffire à déclencher la croissance des micro-organismes lorsqu'on utilise des eaux usées synthétiques, sinon on ajoutera 1 ml/l d'eaux usées décantées à l'alimentation pendant trois jours.

Mesures

36. Vérifier à intervalles réguliers que les débits de dose et les vitesses de rotation restent dans les limites requises. Mesurer aussi le pH de l'effluent, en particulier s'il devrait y avoir une nitrification.

Échantillonnage et analyse

37. La méthode, la répartition et la fréquence de l'échantillonnage sont choisies en fonction de la finalité de l'essai. Prélever au hasard des échantillons d'eaux à traiter et d'effluents, par exemple, ou récolter des échantillons sur une période plus longue, comprise entre trois et six heures, par exemple. Durant la première période, à savoir en l'absence de substance d'essai, prélever des échantillons deux fois par semaine. Les échantillons sont filtrés à travers des membranes ou centrifugés à quelque 40 000 m/s² pendant environ 15 minutes (paragraphe 18). Il peut être nécessaire de décanter et/ou de filtrer grossièrement les échantillons avant leur filtration à travers la membrane. Déterminer le COD (ou la DCO) au moins deux fois et, selon les besoins, la DBO, l'ammonium, les nitrites et les nitrates.
38. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible après la collecte et la préparation des échantillons. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, les conserver par congélation, acidification ou adjonction d'une substance toxique appropriée [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Période de mise en route

39. Durant cette période, le biofilm superficiel se développe jusqu'à atteindre une épaisseur optimale, ce qui prend normalement environ deux semaines et ne doit pas en dépasser six. L'élimination (paragraphe 44) du COD (ou de la DCO) s'accroît et atteint un plateau. Lorsque le plateau présente la même valeur dans les deux tubes, sélectionner le tube qui servira de témoin pour le restant de l'essai, au cours duquel leur fonctionnement devra conserver les mêmes caractéristiques..

Introduction de la substance d'essai

40. À ce stade, ajouter la substance d'essai dans l'autre réacteur à la concentration requise, ordinairement 10 à 20 mg C/l. Le témoin continue de ne recevoir que le milieu organique.

Période d'acclimatation

41. Poursuivre les analyses bihebdomadaires du COD (ou de la DCO) et, s'il faut évaluer la biodégradabilité primaire, mesurer aussi la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Appliquer une période d'acclimatation d'une à six semaines (ou davantage dans des conditions spéciales) après la première adjonction de la substance d'essai. Lorsque le pourcentage d'élimination (paragraphe 43-45) atteint son maximum, déterminer 12 à 15 valeurs valables au cours de la phase plateau sur environ trois semaines, afin d'évaluer le pourcentage d'élimination moyen. L'essai est considéré comme terminé si un degré d'élimination suffisamment élevé a été obtenu. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après la première introduction de la substance d'essai.

▼ M4*Détachement du film*

42. Le brusque détachement de grandes quantités de film excédentaire des tubes («sloughing») se produit assez régulièrement. On veillera à ce que ce processus n'altère pas la comparabilité des résultats, en laissant les essais couvrir au moins deux cycles complets de croissance et de détachement.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Traitement des résultats**

43. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD (ou de DCO) pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)] / C_s \%$$

où:

D_t = pourcentage d'élimination du COD (ou de la DCO) à l'instant t ;

C_s = concentration de COD (ou DCO) dans les eaux à traiter due à la substance d'essai, estimée de préférence d'après la concentration dans la solution mère et le volume de cette solution ajouté (mg/l);

E = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_0 = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

Répéter le calcul pour la substance de référence, le cas échéant.

Résultats du réacteur témoin

44. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO (D_B) du milieu organique dans les réacteurs témoins est utile pour évaluer l'activité de biodégradation du biofilm durant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = 100 (1 - E_0 / C_m) \%$$

où:

C_m = COD (ou DCO) du milieu organique dans les eaux à traiter témoins (mg/l).

45. Calculer l'élimination (D_{ST}) de la substance d'essai, si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique, à chaque instant d'évaluation à partir de l'équation suivante:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e / S_i) \%$$

où:

S_i = concentration mesurée ou, de préférence, estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l)

S_e = concentration mesurée de la substance d'essai dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l)

▼ M4

Si la méthode d'analyse donne une valeur positive dans les eaux usées non améliorées équivalente à S_c mg/l, calculer le pourcentage d'élimination (D_{SC}) selon la formule suivante:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c) / (S_i + S_c) \%$$

Expression des résultats de l'essai

46. Porter sur un graphique les pourcentages d'élimination D_t et D_{ST} (ou D_{SC}), s'ils sont disponibles, en fonction du temps (voir appendice 2 du chapitre C.10-A). Prendre la moyenne (arrondie au nombre entier le plus proche) et l'écart-type des 12 à 15 valeurs de D_t (et de D_{ST} , le cas échéant) obtenue au cours de la phase plateau comme pourcentage d'élimination de la substance d'essai. L'allure de la courbe d'élimination permet de tirer certaines conclusions sur les processus d'élimination.

Adsorption

47. Si on observe une élimination substantielle de la substance d'essai en termes de COD au début de l'essai, c'est probablement à cause de l'adsorption de cette substance sur le biofilm. Il devrait être possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée sur les solides qui se détachent du film. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; le degré d'élimination est normalement élevé au début, puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si, toutefois, la substance d'essai adsorbée est de nature à acclimater la population de micro-organismes, l'élimination de la substance d'essai en termes de COD augmenterait pour atteindre une valeur de plateau élevée.

Phase de latence

48. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries responsables de la dégradation s'acclimentent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai; ensuite elles commencent à croître. Après l'achèvement de cette phase, on considère de manière arbitraire que la phase de dégradation débute lorsque 10 pour cent environ de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (après avoir laissé l'adsorption se produire, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

49. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée grosso modo par 12 à 15 valeurs mesurées valables.

Degré d'élimination moyen de la substance d'essai

50. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination D_t (et D_{ST} le cas échéant) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 pour cent), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 pour cent de la valeur moyenne. Calculer de la même manière le degré moyen (D_B) d'élimination du milieu organique dans le récipient témoin.

▼ **M4****Indication de la biodégradation**

51. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur le biofilm et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphe 48, 49), l'élimination mesurée est avec certitude attribuable à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées sur des échantillons du film ou effectuer des essais de biodégradation statiques (de sélection) supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais reposant sur la consommation d'oxygène (chapitre C.4 de la présente annexe, D, E et F) (9) ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone (chapitre C.4-C de la présente annexe ou méthode de l'espace de tête – ou de l'espace tête) (10); il convient d'utiliser comme inoculum un biofilm préexposé issu du bioréacteur approprié.
52. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives entre les pourcentages observés (le premier étant inférieur au second) indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader; ceux-ci doivent être examinés.

Validité des résultats de l'essai

53. Considérer l'essai comme valable si le degré d'élimination (D_B) du COD ou de la DCO dans les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines de fonctionnement et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.
54. Si une substance de référence facilement biodégradable a été mise à l'essai, le degré de biodégradation doit être supérieur à 90 pour cent et la différence entre des valeurs mesurées en parallèle ne doit pas excéder 5 pour cent. Faute de satisfaire à ces deux critères, réexaminer les méthodes expérimentales et/ou prélever des eaux usées domestiques à une autre source.
55. De même, les différences de valeurs de biodégradation entre deux unités identiques (le cas échéant) traitant une substance d'essai ne doivent pas s'écarter de plus de cinq pour cent. Si ce critère n'est pas rempli, mais que l'élimination est élevée, poursuivre l'analyse pendant trois semaines supplémentaires. Si l'élimination est faible, étudier les effets inhibiteurs de la substance d'essai, s'ils ne sont pas connus, et recommencer l'essai à une concentration plus basse de la substance d'essai, si c'est possible.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai doit livrer les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nature chimique,
- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

- toute modification du système d'essai, notamment si des substances volatiles ou insolubles ont été testées,
- type de milieu organique,
- proportion et nature des déchets industriels dans les eaux usées, si cette information est pertinente et connue,
- méthode d'inoculation,

▼ **M4**

- solution mère de la substance d'essai – teneurs en COD (carbone organique dissous) et COT (carbone organique total); mode de préparation, dans le cas d'une suspension; concentration(s) d'essai utilisée(s), justification des concentrations de COD qui sortiraient de l'intervalle 10-20 mg/l; méthode d'addition; date de la première adjonction; toute variation de concentration,
- temps de rétention hydraulique moyen (sans croissance); vitesse de rotation du tube, angle d'inclinaison approximatif, si possible,
- détails du détachement du biofilm; moment et intensité,
- température d'essai et gamme de températures,
- techniques d'analyse employées.

Résultats de l'essai:

- toutes les valeurs mesurées: COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, composés azotés, le cas échéant,
- toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{tc}), D_B , D_s présentées sous forme de tableaux et de courbes d'élimination,
- informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai, de la substance de référence (si testée) et du milieu organique (dans l'unité témoin), données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,
- examen des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

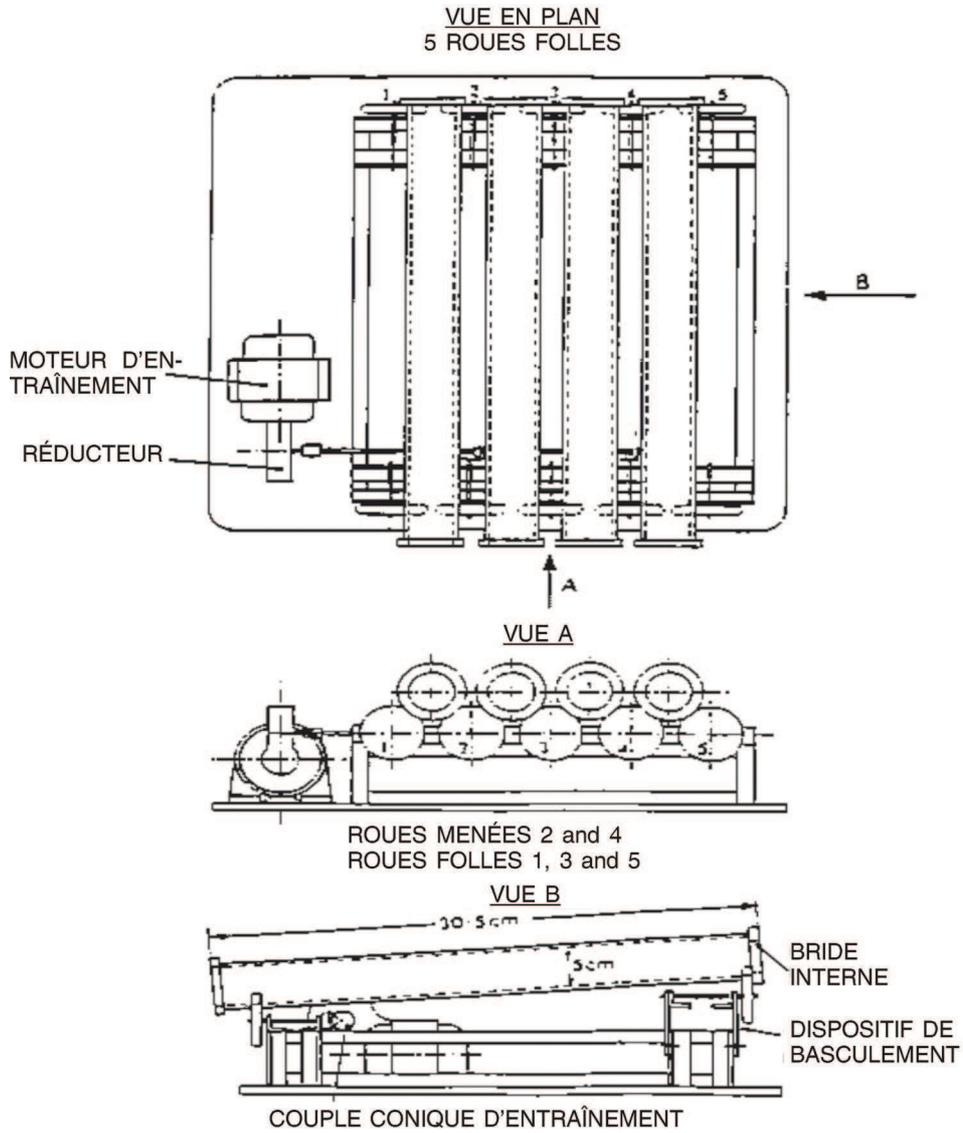
- (1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
- (2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
- (3) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.
- (4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- (5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92-94.
- (6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- (9) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile», A-F.
- (10) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques. Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).

▼ **M4**

Appendice 8

Figure 1

Tubes rotatifs



Glossaire

vue en plan.

vue A/B.

roues menées.

roues folles.

moteur d'entraînement.

réducteur.

bride interne.

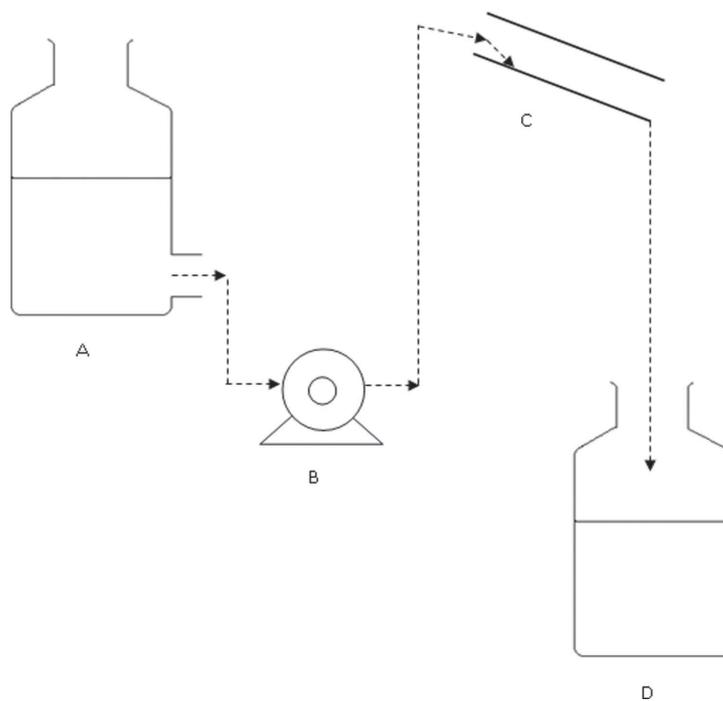
dispositif de basculement.

couple conique d'entraînement.

▼ M4

Figure 2

Schéma de déroulement



A: réservoir.

B: pompe péristaltique.

C: tube rotatif.

D: récipient recueillant les effluents.

DÉFINITIONS:

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Substances chimiques: «il est à noter que le terme “produit chimique” utilisé dans les accords de la CNUED et dans les documents ultérieurs comprend les substances, les produits, les mélanges, les préparations et tout autre terme utilisé dans les systèmes actuels pour décrire les produits chimiques visés».

▼B**C. 11 BIODÉGRADATION****BOUES ACTIVÉES; ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

La méthode décrite évalue l'effet d'une substance d'essai sur les micro-organismes en mesurant le rythme de respiration dans des conditions déterminées, en présence de différentes concentrations de la substance.

L'objectif de cette méthode est de fournir un procédé de sélection rapide permettant d'identifier les substances d'essai qui peuvent nuire au fonctionnement des installations de traitement biologique aérobie et de faire une estimation des concentrations adéquates non inhibitrices des substances d'essai à utiliser dans les expériences de biodégradabilité.

Un essai de détermination de l'ordre de grandeur peut précéder l'essai plus complet. Il fournit des informations sur la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai principal.

En plus des essais avec la substance étudiée, on effectue deux essais témoins, l'un au début et l'autre à la fin de série expérimentale. Chaque lot de boue activée doit également être vérifié à l'aide d'une substance de référence.

Cette méthode s'applique surtout aux substances qui, en raison de leur solubilité dans l'eau et de leur faible volatilité, sont susceptibles de demeurer dans l'eau.

Pour les substances dont la solubilité dans le milieu d'essai est limitée, il peut ne pas être possible de déterminer la CE_{50} .

Les résultats basés sur la consommation d'oxygène peuvent mener à des conclusions erronées lorsqu'une substance d'essai a tendance à interférer sur la phosphorylation oxydative.

Il est utile de disposer des informations suivantes pour faire l'essai:

- solubilité dans l'eau,
- tension de vapeur,
- formule de structure,
- pureté de la substance d'essai.

Recommandation:

Les boues activées peuvent contenir des organismes pathogènes et doivent être manipulées avec prudence.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le taux de respiration est la consommation d'oxygène des micro-organismes aérobies contenus dans les boues ou dans les eaux usées, exprimée généralement en $mg\ O_2$ par milligramme de boue, par heure.

▼B

Pour calculer l'effet inhibiteur d'une substance d'essai, à une concentration donnée, le taux de respiration est exprimé en pourcentage de la moyenne des taux de respiration des deux témoins:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{pourcentage d'inhibition}$$

ou:

R_s = taux de consommation de l'oxygène à une concentration donnée en substance étudiée,

R_{c1} = taux de consommation d'oxygène du Témoin C_1 ,

R_{c2} = taux de consommation d'oxygène du témoin C_2 .

Dans cette méthode, la CE_{50} est la concentration de la substance d'essai pour laquelle le taux de respiration est égal à 50 % de celui des témoins dans les conditions décrites.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé d'utiliser comme substance de référence le 3,5-dichlorophénol, qui est un inhibiteur connu de la respiration. Pour chaque lot de boue activée, on mesure la CE_{50} de cette substance, afin de déterminer si la sensibilité de la boue n'est pas anormale.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

On mesure le taux de respiration d'une boue activée alimentée en une quantité donnée d'effluent synthétique après un temps de contact de 30 minutes ou de 3 heures, ou à ces deux moments. On mesure également dans des conditions identiques le taux de respiration de la même boue activée en présence de la substance d'essai à différentes concentrations. L'effet inhibiteur de la substance d'essai à une concentration donnée s'exprime en pourcentage de la valeur moyenne des taux de respiration des deux témoins. À partir des déterminations faites à différentes concentrations, on calcule une valeur de la CE_{50} .

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Les résultats sont valables si:

- les taux de respiration des deux témoins ne diffèrent pas l'un de l'autre de plus de 15 %,
- la CE_{50} (30 minutes et/ou 3 heures) du 3,5-dichlorophénol se situe dans l'intervalle 5 à 30 mg/l.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de la substance d'essai

Des solutions de la substance d'essai sont préparées au début de l'essai à partir d'une solution de réserve. Une solution de réserve à 0,5 g/l convient quand le mode opératoire indiqué ci-dessous est suivi.

▼B

1.6.1.2. Solution de la substance de référence

On peut préparer par exemple une solution de 3,5-dichlorophénol en dissolvant 0,5 g de 3,5-dichlorophénol dans 10 ml de 1M NaOH, en diluant à 30 ml à l'eau distillée, en ajoutant, tout en agitant, du 0,5M H₂SO₄ jusqu'au point où la précipitation commence — environ 8 ml sont nécessaires — et, enfin, en diluant à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH devrait alors être compris dans l'intervalle 7 à 8.

1.6.1.3. Effluent synthétique

On prépare un effluent synthétique en dissolvant les quantités suivantes de substance dans 1 litre d'eau:

- 16 g de peptone,
- 11g d'extrait de viande,
- 3 g d'urée,
- 0,7 g de NaCl,
- 0,4g de CaCl₂·2H₂O,
- 0,2 g de MgSO₄·7H₂O,
- 2,8 g de K₂HP0₄.

Note 1: Cet effluent synthétique est 100 fois plus concentré que celui décrit dans le rapport technique de l'OCDE «Méthode proposée pour la détermination de la biodégradabilité des agents tensio-actifs utilisés dans les détergents synthétiques» du 11 juin 1976, et contient en outre de l'hydrogénophosphate de potassium.

Note 2: Si le milieu ainsi préparé n'est pas immédiatement utilisé, il sera stocké à l'obscurité, entre 0 et 4 °C pendant une durée maximale d'une semaine, dans des conditions qui ne conduiront à aucun changement en ce qui concerne sa composition. Le milieu peut aussi être stérilisé avant son stockage, ou bien la peptone et l'extrait de viande peuvent être ajoutés immédiatement avant le début de l'essai. Avant son emploi, le milieu sera agité avec soin et son pH sera ajusté.

1.6.2. Équipement

Appareil de mesure: aucune prescription n'est fournie à ce sujet. Toutefois, il faut veiller à ce qu'il n'y ait pas de volume libre au-dessus du liquide et à ce que l'électrode s'adapte parfaitement au récipient.

Un équipement normal de laboratoire et notamment les articles suivants sont nécessaires:

- appareil de mesure,
- dispositif d'aération,
- électrode et appareil de mesure pour le pH,
- électrode à oxygène.

1.6.3. Préparation de l'inoculum

Comme inoculum pour l'essai, on utilise de la boue activée provenant d'une installation de traitement des eaux usées traitant un effluent à dominance domestique.

En cas de nécessité, à l'arrivée au laboratoire, les grosses particules pourront être éliminées par sédimentation pendant une courte période, par exemple pendant 15 minutes, puis par décantation des particules fines de la couche supérieure. Comme solution alternative, la boue peut être agitée quelques secondes au moyen d'un mixeur.

▼B

Si des produits inhibiteurs sont présents la boue peut être lavée avec de l'eau du robinet ou avec la solution isotonique. Après centrifugation, le surnageant est décanté (cette manipulation est répétée 3 fois).

Une petite quantité de boue est pesée et séchée. À partir de ce résultat, il est possible de déterminer la quantité de boue humide qui doit être mise en suspension dans l'eau dans le but d'obtenir une boue activée renfermant 2 à 4 g/l de matières en suspension. Cette concentration permet d'obtenir une teneur en matières en suspension comprise entre 0,8 et 1,6 g/l dans le milieu d'essai, si le protocole expérimental recommandé est appliqué.

Si la boue ne peut être utilisée le jour même de sa collecte, on ajoute 50 ml d'effluent synthétique à chaque litre de boue activée préparée de la façon décrite ci-dessus; elle est ensuite aérée toute la nuit à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Elle est alors conservée sous aération en vue de son emploi dans la journée. Avant de l'utiliser, on vérifie le pH et, si nécessaire, on l'ajuste de façon à atteindre un pH se situant entre 6,0 et 8,0. La teneur en matière en suspension du mélange peut être déterminée selon la méthode décrite dans le précédent paragraphe.

Si l'on doit utiliser le même lot de boue pendant plusieurs jours consécutifs (4 au maximum), on ajoute un autre volume de 50 ml d'effluent synthétique par litre de boue à la fin de chaque jour de travail.

1.6.4. *Exécution de l'essai*

| | |
|-------------------------|--|
| Durée/temps de contact: | 30 minutes et/ou 3 heures, pendant lesquelles le milieu d'essai est aéré |
| Eau: | Eau potable (déchlorurée, si nécessaire) |
| Apport d'air: | Air propre, exempt d'huile. Débit d'air de 0,5 à 1 litre par minute |
| Appareil de mesure: | Fiole à fond plat du type DBO |
| Mesure de l'oxygène: | Électrode à oxygène adéquate, avec enregistrement |
| Solution nutritive: | Effluent synthétique (voir ci-dessus) |
| Substance d'essai: | Préparée au début de l'essai |
| Substance de référence: | Par exemple 3,5-dichlorophénol (au moins 3 concentrations) |
| Témoins: | Échantillon inoculé, sans substance d'essai |
| Température: | $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ |

On trouvera ci-après une méthode expérimentale pouvant être appliquée à la fois pour la substance d'essai et pour la substance de référence pendant une période de 3 heures:

On utilise plusieurs récipients (par exemple béciers d'un litre). On peut utiliser au moins 5 concentrations croissantes, selon une progression de raison n'excédant pas 3,2.

Au temps «O», on verse 16 ml d'effluent synthétique dans un verre cylindrique graduée de 500 ml et l'on complète à 300 ml avec de l'eau. On ajoute 200 ml d'inoculum bactérien et l'on verse l'ensemble du mélange dans le premier récipient (premier témoin C₁).

▼B

Les récipients d'essai doivent être aérés en continu de façon à être certain que les concentrations en oxygène dissout ne seront pas inférieures à 2,5 mg/l et qu'immédiatement avant détermination du taux de respiration, la concentration en oxygène dissout sera au moins égale à 6,5 mg/l.

Au temps «15 minutes» (15 minutes représentant un intervalle de temps arbitraire, mais commode), on répète l'opération précédente, sauf que l'on ajoute 100 ml de la solution de réserve de la substance d'essai aux 16 ml d'effluent synthétique avant de procéder à l'addition d'eau jusqu'à 300 ml et d'inoculum jusqu'à 500 ml. Ce mélange est ensuite versé dans le deuxième récipient, puis aéré comme ci-dessus. On recommence cette opération toutes les 15 minutes avec différents volumes de la solution de réserve de la substance d'essai, afin d'obtenir une série de récipients avec des concentrations différentes en substance d'essai. Enfin, on prépare un deuxième témoin (C₂).

Au bout de trois heures, on mesure et note le pH; un échantillon homogène du contenu du premier récipient est versé dans l'appareil de mesure et le taux de respiration est mesuré pendant une période allant jusqu'à 10 minutes.

Cette détermination est répétée sur le contenu de chaque récipient à des intervalles de 15 minutes, de manière à obtenir un temps de contact de 3 heures pour chaque récipient.

La substance de référence est testée de la même façon sur chaque lot d'inoculum bactérien.

Une organisation différente (par exemple plus d'un appareil de mesure d'oxygène) est nécessaire, si les mesures doivent être faites après un contact de 30 minutes.

S'il est nécessaire de mesurer la consommation chimique en oxygène, on ajoute des récipients supplémentaires contenant la substance d'essai, l'effluent synthétique, de l'eau, mais pas de boue activée.

La consommation d'oxygène est mesurée et enregistrée après un temps d'aération de 30 minutes et/ou de 3 heures (temps de contact).

2. TRAITEMENT ET ÉVALUATION DES DONNÉES

Le taux de respiration est calculé à partir du tracé de l'enregistreur en mg O₂/l.h pour les concentrations comprises approximativement entre 6,5 mg de O₂/l et 2,5 mg de O₂/l, ou pendant une période de dix minutes quand le taux de respiration est faible. La partie de la courbe à partir de laquelle on mesure le taux de respiration doit être linéaire.

Si les taux de respiration des deux témoins diffèrent l'un de l'autre de plus de 15 % ou si la CE₅₀ (30 minutes et/ou 3 heures) de la substance de référence n'est pas dans l'intervalle requis (5 à 30 mg/l pour le 3,5-dichlorophénol), l'essai n'est pas valable et doit être recommencé.

Le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque concentration d'essai (voir 1.2). On porte le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration sur du papier log-normal (ou log-probabilité) et on en déduit une valeur de la CE₅₀.

Des limites de confiance à 95 % pour les valeurs de la CE₅₀ peuvent être déterminées par application de méthodes normalement utilisées.

▼B**3. RAPPORT****3.1. RAPPORT D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- substance d'essai: données permettant son identification,
- système d'essai: origine, concentration et traitement préalable éventuel de la boue activée,
- conditions d'essai:
 - pH du mélange avant mesure de la consommation d'oxygène,
 - température d'essai,
 - durée de l'essai,
 - substance de référence et CE_{50} mesurée,
 - consommation chimique d'oxygène (s'il y a lieu),
- résultats:
 - toutes les données obtenues,
 - courbe d'inhibition et méthode de calcul de la CE_{50} ,
 - CE_{50} et, si possible, limites de confiance à 95 %, CE_{20} et $CE_{50,5}$,
 - toutes les observations et tous les écarts par rapport à la méthode d'essai qui auraient pu influencer les résultats.

3.2. INTERPRÉTATION DES DONNÉES

La valeur de la CE_{50} doit simplement être considérée comme une indication de la toxicité probable de la substance d'essai pour le traitement des eaux usées par des boues activées ou pour les micro-organismes des eaux usées. En effet, les interactions complexes qui se produisent dans l'environnement ne peuvent pas être simulées avec précision dans un essai de laboratoire. En outre, les substances testées qui pourraient avoir des effets inhibiteurs sur l'oxydation de l'ammoniaque peuvent fournir des courbes d'inhibition atypiques. En conséquence, de telles courbes doivent être interprétées avec précaution.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) International Standard ISO 8192-1986.
- (2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, p. 165.
- (3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.
- (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method n° 103, also described by:
- (5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.
- (6) Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, p. 247.
- (7) OECD, Paris, 1981, Ligne directrice 209, décision du Conseil C(84) 30 final.

▼B**C. 12. BIODÉGRADATION****TEST S.C.A.S. MODIFIÉ****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Le but de la méthode est de mesurer la biodégradabilité totale potentielle de composés organiques non volatils et solubles dans l'eau, lorsqu'ils sont exposés à des concentrations relativement élevées de micro-organismes pendant une longue période. La viabilité des micro-organismes est maintenue tout au long de cette période par un apport journalier d'eaux résiduaires décantées. (Pendant le week-end, les eaux résiduaires peuvent être stockées à 4 °C. Les eaux résiduaires synthétiques de l'essai de confirmation de l'OCDE peuvent également être utilisées.)

Une adsorption physico-chimique sur les particules solides en suspension peut se produire et doit être prise en considération lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Étant donné la longue période de rétention de la phase aqueuse (36 heures) et l'ajout régulier de substances nutritives, l'essai n'est pas une simulation des conditions rencontrées dans une station d'épuration des eaux usées. Les résultats obtenus avec diverses substances d'essai indiquent que cet essai a un potentiel élevé de biodégradation.

Les conditions dans lesquelles se déroule l'essai facilitent la sélection et/ou l'acclimatation de micro-organismes susceptibles de dégrader la solution d'essai (la procédure peut également être utilisée en vue de préparer un inoculum acclimaté pour d'autres essais).

Dans cette méthode, on mesure la concentration de carbone organique dissous (COD) pour évaluer la biodégradabilité finale des substances d'essai. Il est préférable de déterminer le COD après acidification et purge plutôt qu'en établissant la différence $C_{\text{total}} - C_{\text{minéral}}$.

Le recours simultané à une analyse spécifique permet de déterminer la biodégradabilité primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai:

- sont solubles dans l'eau (au moins 20 mg de COD par litre),
- ont une pression de vapeur négligeable,
- n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries,
- ne font pas l'objet d'une adsorption importante au cours de l'essai,
- ne sont pas éliminées par moussage de la solution d'essai.

La teneur en carbone organique de la substance d'essai doit être déterminée.

▼B

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

Il est souhaitable de connaître le seuil de toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

C_T = concentration de la substance d'essai en carbone organique contenu dans ou ajouté à l'effluent décanté au début de la période d'aération (mg par litre)

C_t = concentration en COD du liquide surnageant de la substance d'essai à la fin de la période d'aération (mg par litre)

C_c = concentration en COD du liquide surnageant du témoin à la fin de la période d'aération (mg par litre)

Dans cette méthode, la biodégradation est déterminée par la disparition du carbone organique. La dégradation biotique peut être exprimée en:

- 1) pourcentage d'élimination de D_{da} de l'apport journalier de la substance:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad (1)$$

où:

D_{da} = dégradation/apport journalier;

- 2) pourcentage d'élimination des substances présentes en début de journée:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

où:

D_{ssd} = dégradation/substance en début de journée.

Les facteurs i et $(i + 1)$ se réfèrent au jour où la mesure a été effectuée.

Il est recommandé d'utiliser l'équation 2(a) si l'effluent COD varie d'un jour à l'autre et l'équation 2(b) lorsque l'effluent COD reste relativement constant d'un jour à l'autre.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Quand on étudie une nouvelle substance, les produits de référence peuvent parfois se révéler utiles; on ne peut cependant pas encore recommander de produits de référence particuliers.

Il est fait mention de données relatives à plusieurs composés qui ont fait l'objet d'essais d'intercomparaison (voir appendice 1), notamment pour pouvoir procéder à l'étalonnage périodique de la méthode et pour permettre de comparer des résultats obtenus par une autre méthode.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Placer des boues activées provenant d'une station d'épuration des eaux usées dans une unité de traitement de boue activée à alimentation semi-continue (SCAS). Ajouter la substance d'essai et des eaux domestiques décantées et aérer le mélange pendant 23 heures. Arrêter ensuite l'aération, mettre la boue à décanter et retirer le liquide surnageant.

Puis, mélanger les boues restées dans l'aérateur à une autre partie aliquote de substance d'essai et d'eaux résiduaires et répéter le cycle.

La biodégradabilité est mesurée en déterminant la teneur en carbone organique dissous du liquide surnageant. Cette valeur est comparée à celle du liquide provenant d'un témoin alimenté uniquement avec des eaux domestiques décantées.

Lorsqu'on effectue une analyse spécifique, la modification de la concentration de la molécule mère en fonction de la biodégradabilité peut être mesurée (biodégradation primaire).

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité de cette méthode basée sur l'élimination de COD n'a pas encore été établie (en ce qui concerne la biodégradation primaire, on obtient des données très précises pour les substances qui sont fortement dégradées).

La sensibilité de la méthode est en grande partie conditionnée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination de COD et par la concentration de la substance d'essai dans le liquide au début de chaque cycle.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. *Préparations*

Réunir un nombre suffisant d'unités d'aération (l'unité d'essai SCAS de 1,5 litre peut également être utilisée) et de tuyaux d'aération (figure 1) pour chaque substance d'essai et de référence. L'air comprimé fourni aux unités d'essai, nettoyées au moyen d'un filtre de coton hydrophile, ne doit pas contenir de carbone organique et doit être saturé préalablement à l'eau pour réduire les pertes dues à l'évaporation.

Prélever un échantillon de liqueur mixte, contenant de 1 à 4 grammes de solides en suspension par litre dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux ménagères. Prévoir environ 150 ml de liqueur mixte par aérateur.

▼B

Préparer la solution mère de la substance d'essai dans de l'eau distillée; la concentration normalement requise est de 400 mg/l de carbone organique, ce qui donne une concentration en carbone de la substance d'essai de 20 mg/l au début de chaque cycle d'aération s'il n'y a pas de biodégradation.

Des concentrations plus élevées peuvent être utilisées si la toxicité vis-à-vis des micro-organismes le permet.

On mesure la teneur en carbone organique de la solution mère.

1.6.2. *Mode opératoire*

L'essai doit être effectué à une température comprise entre 20 et 25 °C.

Utiliser une concentration élevée de micro-organismes aérobies (de 1 à 4 g/l de matières en suspension) et respecter une période de rétention effective de 36 heures. Largement oxyder les substances carbonées dans l'effluent d'alimentation, normalement pendant une période de 8 heures suivant le début de chaque cycle d'aération. Laisser ensuite respirer la boue en façon endogène pendant le reste de la période d'aération. Le seul substrat disponible est la substance d'essai, à moins qu'elle n'ait été également métabolisée. Ces conditions, combinées à une réinoculation journalière de l'essai lorsque des eaux domestiques sont utilisées comme milieu, sont extrêmement favorables à l'acclimatation et à une biodégradation rapide.

1.6.3. *Réalisation de l'essai*

Prélever un échantillon de liqueur mixte dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux domestiques ou dans une unité de laboratoire et le maintenir en aérobiose jusqu'à son utilisation en laboratoire. Chaque aérateur ainsi que l'unité de référence sont remplis avec 150 ml (en cas d'utilisation de l'unité d'essai SCAS originelle, il faut multiplier les volumes donnés par 10) de liqueur mixte et l'aération commence. Après 23 heures, l'aération est arrêtée et on laisse reposer les boues pendant 45 minutes. Ouvrir un à un les robinets de chaque récipient et retirer 100 ml du liquide surnageant. Prélever un échantillon des eaux domestiques décantées immédiatement avant l'utilisation et ajouter 100 ml aux boues demeurant dans chaque aérateur. L'aération est répétée. À ce stade, ne plus ajouter aucune substance d'essai et alimenter journallement les unités avec des eaux ménagères jusqu'à l'obtention d'un liquide surnageant limpide lors de la précipitation. Cette opération prend normalement deux semaines. À ce moment, le COD dans le liquide surnageant à la fin de chaque cycle d'aération tend vers une valeur constante.

À la fin de cette période, mélanger les boues décantées individuellement et ajouter 50 ml de boues composites à chaque unité.

Ajouter 95 ml d'eaux résiduaires décantées et 5 ml d'eau aux unités de référence et 95 ml d'eaux résiduaires décantées et 5 ml de solution mère de la substance d'essai appropriée (400 mg par litre) aux unités d'essai. Procéder à une nouvelle aération pendant 23 heures. Laisser les boues décanter pendant 45 minutes, retirer le liquide surnageant et l'analyser pour déterminer sa teneur en COD.

Cette procédure de prélèvement et de remplissage décrite ci dessus est répétée tous les jours pendant la période de l'essai.

▼B

Avant la décantation, il peut s'avérer nécessaire de nettoyer les parois des unités afin d'empêcher l'accumulation de solides au-dessus du niveau du liquide. Pour nettoyer chaque unité, un hérisson ou une brosse séparée sont utilisés afin d'empêcher la contamination croisée.

Théoriquement, il faudrait déterminer journallement le COD dans les liquides surnageants, mais des analyses moins fréquentes sont autorisées. Avant d'être analysées, les liqueurs doivent être filtrées sur une membrane de 0,45 µm ou centrifugées. Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'absorbent pas la substance d'essai au cours de la filtration. La température de l'échantillon ne doit pas dépasser 40 °C lorsqu'il se trouve dans la centrifugeuse.

La durée de l'essai pour les composés peu ou non biodégradables est indéterminée, mais l'expérience démontre qu'il faut compter au moins 12 semaines et qu'il ne faut pas dépasser 26 semaines.

2. DONNÉES ET ÉVALUATION

La courbe de la teneur en COD des liquides surnageants des unités d'essai et des unités de référence est établie en fonction du temps.

Lorsque la biodégradation est terminée, le niveau constaté dans la substance d'essai est voisin de celui du témoin. Lorsque la différence entre ces deux niveaux ne varie plus sur trois mesures consécutives, il suffit alors d'obtenir un nombre de mesures complémentaires suffisantes pour permettre l'analyse statistique des données et de calculer le pourcentage de biodégradation de la substance d'essai (D_{da} ou D_{ssd} : voir 1.2).

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

- toutes les informations relatives à la nature des eaux résiduaires, au type d'unité utilisé et aux résultats expérimentaux concernant la substance d'essai, à la substance de référence s'il y a lieu et au témoin,
- la température,
- la courbe de disparition avec description, mode de calcul (voir 1.2),
- la date et l'endroit du prélèvement des échantillons de boues activées et d'eaux résiduaires, le degré d'acclimatation, de concentration etc.,
- les raisons scientifiques de toute modification du mode opératoire,
- la signature et la date.

▼B

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Étant donné que, en l'occurrence, la substance d'essai n'est pas facilement biodégradable, toute disparition de COD due uniquement à la biodégradation devrait se faire graduellement sur une période de quelques jours ou de quelques semaines, sauf dans les cas où l'acclimatation est soudaine, ce qui se traduit par une brusque disparition après quelques semaines.

Toutefois, l'adsorption physico-chimique peut parfois jouer un rôle important; cela se manifeste par la disparition partielle ou complète du COD ajouté au départ. Ce qui se passe ultérieurement dépend de facteurs tels que les degrés d'adsorption et de concentration des solides en suspension dans l'effluent écarté. Généralement, la différence de concentration en COD dans les liquides surnageants d'essai et de référence augmente graduellement à partir d'une valeur initiale peu élevée et se maintient au niveau de la nouvelle valeur pour la durée restante de l'expérience, à moins qu'une acclimatation n'intervienne.

Pour distinguer la biodégradation (ou la biodégradation partielle) de l'adsorption, il faut procéder à d'autres essais. Il existe plusieurs méthodes mais la plus probante consiste à utiliser les liquides surnageants ou les boues comme inoculum dans un test du dossier de base (de préférence un test respirométrique).

Les substances d'essai faisant disparaître de grandes quantités de COD sans adsorption doivent être considérées comme potentiellement biodégradables. Une disparition partielle, qui n'est pas due à l'adsorption, indique que le produit est susceptible de se dégrader partiellement.

Des disparitions de COD peu importantes ou nulles peuvent être dues à l'inhibition de micro-organismes par des substances d'essai, ce qui peut également se traduire par lyses et perte de boues; dans ce cas, les liquides surnageants sont troubles. Le test doit alors être répété en utilisant une concentration moins élevée de substances d'essai.

L'utilisation d'une analyse spécifique ou d'une substance d'essai marquée au ^{14}C peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas d'un composé d'essai marqué au ^{14}C , la récupération de $^{14}\text{CO}_2$ confirmera la biodégradation.

Lorsque les résultats sont également exprimés en termes de biodégradation primaire, il convient de donner, dans la mesure du possible, des explications sur les modifications intervenues dans les structures chimiques aboutissant au défaut de réponse de la substance d'essai mère.

La validation de l'analyse doit être indiquée avec le résultat obtenu dans le milieu de l'essai témoin.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE, Paris, Lignes directrices 302 A, décision du Conseil C(81) 30 final.

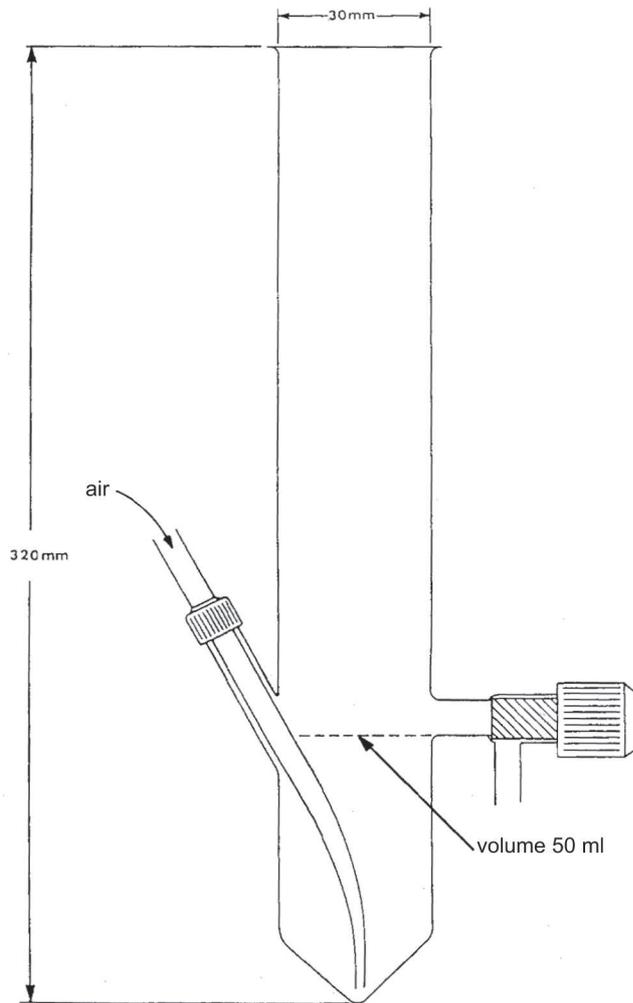
▼B*Appendice 1***Test S.C.A.S.: exemple de résultats**

| Substance | C_T (mg/l) | $C_t - C_c$ (mg/l) | Pourcentage biodégradation D_{da} | Durée de l'essai (jours) |
|------------------------------------|-----------------|-----------------------|---|-----------------------------|
| 4-acétyl aminobenzène sulphonate | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| Tetra propylène benzène sulphonate | 17,3 | 8,4 | 51,4 | 40 |
| 4-nitrophénol | 16,9 | 0,8 | 95,3 | 40 |
| Diéthylène glycol | 16,5 | 0,2 | 98,8 | 40 |
| Aniline | 16,9 | 1,7 | 95,9 | 40 |
| Cyclopentane tétra carboxylate | 17,9 | 3,2 | 81,1 | 120 |

▼B

Appendice 2

Exemple d'appareil d'essai



C.13 — I: Essai de bioconcentration chez le poisson par exposition via le milieu aquatique

PRINCIPE DE L'ESSAI

L'essai se déroule en deux phases: l'exposition (absorption) et la post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, un groupe de poissons d'une même espèce est exposé à la substance d'essai à une ou plusieurs concentrations, en fonction des propriétés de la substance (voir paragraphe 49). Ces poissons sont ensuite transférés vers un milieu dépourvu de la substance d'essai, pour la phase d'élimination. La phase d'élimination est toujours nécessaire, sauf si l'absorption de la substance au cours de la phase d'absorption est négligeable. La concentration de la substance d'essai dans ou sur le poisson (ou dans un tissu spécifié de cet animal) est suivie au cours des deux phases de l'essai. Outre le groupe exposé, un groupe témoin de poissons est élevé dans des conditions identiques, sans être exposé à la substance d'essai, afin de comparer les éventuels effets nocifs observés dans l'essai de bioconcentration au comportement d'un groupe témoin analogue et d'obtenir la concentration naturelle de la substance d'essai ⁽¹⁾.

Dans l'essai par exposition via le milieu aquatique, la phase d'absorption dure généralement 28 jours. Cette durée peut au besoin être prolongée (voir paragraphe 18), ou raccourcie s'il est démontré que l'état stationnaire a été atteint plus tôt (voir définitions et unités à l'appendice 1). Il est possible de prédire la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire à l'instauration de l'état stationnaire à partir des équations données à l'appendice 5. La phase d'élimination, au cours de laquelle les poissons ne sont plus exposés à la substance d'essai, débute ensuite, les poissons étant transférés dans un récipient propre contenant un milieu identique, mais dépourvu de la substance d'essai. Il est préférable, dans la mesure du possible, de calculer le facteur de bioconcentration de deux manières, d'une part le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES} ; voir définition à l'appendice 1), à savoir le rapport de la concentration dans les poissons (C_p) à la concentration dans l'eau (C_e) et, d'autre part, le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k ; voir définitions et unités à l'appendice 1), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption (k_1) à la constante cinétique d'élimination (k_2) dans l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre ⁽²⁾.

Si après 28 jours l'état stationnaire n'est pas encore atteint, il convient soit de calculer le FBC par la méthode cinétique (voir paragraphe 38) soit de prolonger la phase d'absorption. Si le temps requis pour atteindre l'état stationnaire est trop long dans la pratique (voir paragraphes 37 et 38 et appendice 5), on préférera la méthode cinétique. Pour les substances très hydrophobes, on envisagera de pratiquer l'essai par voie alimentaire ⁽³⁾, si celui-ci respecte la réglementation en vigueur.

La constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination (pertes) — ou les constantes, si des systèmes plus complexes sont en jeu —, le facteur de bioconcentration (à l'état stationnaire et/ou cinétique) et, si possible, l'intervalle de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir du modèle qui décrit le mieux les concentrations de la substance d'essai mesurées dans les poissons et dans l'eau (voir appendice 5).

La prise de poids des poissons durant l'essai provoquera chez eux une baisse de la concentration de la substance d'essai (c'est ce qu'on appelle la dilution par la croissance). Le FBC cinétique sera donc sous-estimé s'il n'est pas corrigé en conséquence (voir paragraphes 72 et 73).

Le FBC est déduit à partir de la concentration totale dans le poisson (autrement dit en fonction du poids frais total du poisson). On pourra toutefois utiliser des tissus ou des organes déterminés (par exemple les muscles, le foie) pour des raisons particulières, si le poisson est suffisamment grand ou s'il peut être divisé en fractions comestibles (filets) et non comestibles (viscères). Il existe une nette relation entre le potentiel de bioconcentration et l'hydrophobicité pour beaucoup de substances organiques, qui implique une autre relation entre la teneur en lipides du poisson d'essai et la valeur observée de la bioconcentration de ces substances. Dès lors, afin de réduire cette source de variabilité dans les résultats des essais portant sur des substances très lipophiles (c'est-à-dire dont le $\log K_{OE}$ est inférieur à 3), il convient d'exprimer la bioconcentration de façon normalisée rapportée à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % (de son poids corporel total), outre la bioconcentration obtenue directement de l'essai. Cela est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats obtenus pour différentes substances et/ou espèces d'essai. Une teneur en lipides de 5 % est généralement utilisée, car c'est la teneur moyenne en lipides des poissons le plus souvent utilisés dans le cadre de cette méthode d'essai (21)

⁽¹⁾ Pour la plupart des substances d'essai, aucune concentration ne doit, dans l'idéal, être détectée dans l'eau témoin. Des concentrations ne doivent se retrouver que pour des matériaux d'origine naturelle (par exemple certains métaux) et des substances omniprésentes dans l'environnement.

⁽²⁾ Si, de toute évidence, le système n'obéit pas à une cinétique du premier ordre, il convient de recourir à des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'appendice 5 et demander conseil à un biostatisticien).

⁽³⁾ L'absorption peut être limitée par des concentrations d'exposition basses dues à la faible hydrosolubilité de la substance dans l'essai de bioconcentration; l'essai par voie alimentaire permettra, lui, d'atteindre des concentrations d'exposition beaucoup plus fortes.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

En dehors des propriétés de la substance d'essai énumérées dans l'introduction (paragraphe 3), il y a lieu de connaître sa toxicité pour l'espèce de poisson utilisée dans l'essai, de préférence la CL_{50} asymptotique (indépendante du temps) et/ou sa toxicité estimée lors d'essais à long terme sur des poissons [voir notamment les méthodes d'essai C.47 (22), C.15 (23), C.14(24)].

Il convient de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît la fiabilité, la précision et la sensibilité, pour quantifier la substance dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique, ainsi que d'instructions précises pour la préparation et le stockage des échantillons. Il convient que la limite analytique de quantification de la substance d'essai dans l'eau et dans les tissus des poissons soit aussi connue. Lorsqu'on utilise une substance marquée à la radioactivité, il convient qu'elle présente une pureté très élevée (de préférence supérieure à 98 %) et que le pourcentage de radioactivité des impuretés soit connu.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai est subordonnée à la réalisation des conditions suivantes:

la variation de la température est inférieure à $\pm 2^{\circ}\text{C}$, car des écarts importants peuvent influencer les paramètres biologiques pertinents pour l'absorption et l'élimination, mais aussi stresser les poissons;

la concentration de l'oxygène dissous reste supérieure ou égale à 60 % de saturation;

la concentration de la substance d'essai dans les chambres est maintenue dans un intervalle de $\pm 20\%$ autour de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption;

la concentration de la substance d'essai est inférieure à sa limite de solubilité dans l'eau, en tenant compte de l'effet éventuel de l'eau d'essai sur la solubilité réelle ⁽¹⁾;

la mortalité, les maladies ou d'autres effets nocifs chez les poissons traités et témoins sont inférieurs à 10 % à la fin de l'essai; lorsque l'essai dure plusieurs semaines ou mois, la mortalité ou d'autres effets nocifs dans les deux groupes de poissons sont inférieurs à 5 % par mois et ne dépasseront pas 30 % en tout. Des différences significatives de croissance moyenne entre les échantillons du groupe d'essai et du groupe témoin pourraient indiquer un effet toxique de la substance d'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il serait utile de disposer de substances de référence à faible métabolisme et potentiel de bioconcentration connu pour vérifier le mode opératoire, le cas échéant (par exemple quand un laboratoire n'a encore jamais réalisé l'essai ou quand les conditions expérimentales ont été modifiées).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

Il convient qu'aucune partie du montage ne comporte de matériaux susceptibles d'être dissous, lessivés ou sorbés et de nuire aux poissons. Des récipients classiques, rectangulaires ou cylindriques, composés d'un matériau chimiquement inerte et dotés d'une capacité adaptée au taux de charge (voir paragraphe 43), peuvent être utilisés. Il convient de minimiser l'emploi des tubes en plastique souple. On choisira des tubes en polytétrafluoroéthylène, en acier inoxydable ou en verre. L'expérience a montré qu'en présence de substances d'essai à coefficient d'adsorption élevé, telles que les pyrèthrine synthétiques, il sera peut-être nécessaire d'utiliser du verre silanisé. Dans ces circonstances, l'appareillage devra être jeté après usage. Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations voulues de la substance d'essai aussi longtemps que nécessaire pour démontrer le maintien de concentrations d'exposition stables avant l'introduction des organismes d'essai.

⁽¹⁾ Pour les substances multi-composants comme les UVCB (substances de composition inconnue ou variable) et les mélanges, l'hydrosolubilité de chaque composant pertinent est examinée pour déterminer les concentrations d'exposition appropriées.

Eau

Pour l'essai, on utilise généralement une eau naturelle obtenue à partir d'une source non contaminée et de qualité constante. Néanmoins, l'eau reconstituée (eau déminéralisée dans laquelle des nutriments spécifiques ont été ajoutés en quantités connues) peut être plus adaptée pour garantir une qualité uniforme dans le temps. La qualité de l'eau de dilution, c'est-à-dire de l'eau mélangée avec la substance d'essai avant d'être introduite dans le récipient d'essai (voir paragraphe 30), doit permettre à l'espèce de poisson choisie de survivre pendant la durée de l'acclimatation et de l'essai, sans présenter d'anomalies sur le plan du comportement ou de l'apparence. Idéalement, il faudrait démontrer que l'espèce testée peut survivre, croître et se reproduire dans l'eau de dilution (par exemple par un élevage en laboratoire ou par un essai de toxicité sur la totalité du cycle de vie). L'eau de dilution est au moins caractérisée par le pH, la dureté, les solides totaux, le carbone organique total (COT⁽¹⁾) et de préférence aussi l'ammonium, les nitrites et l'alcalinité, ainsi que la salinité dans le cas des espèces marines. Les paramètres qui commandent le bien-être optimal des poissons ne sont pas entièrement connus, mais l'appendice 2 fournit les concentrations maximales recommandées de plusieurs paramètres pour des espèces d'eau douce et d'eau de mer.

Il convient que la qualité de l'eau de dilution reste constante tout au long de l'essai. Le pH est compris entre 6,0 et 8,5 au début de l'essai, mais sans varier au-delà de $\pm 0,5$ unité de pH au cours d'un essai donné. On analysera des échantillons prélevés à divers intervalles, afin de veiller à ce que l'eau de dilution n'influence les résultats de l'essai (par exemple par complexation de la substance d'essai) ou ne perturbe le comportement des poissons, au moins au début et à la fin de l'essai. Il convient de déterminer les métaux lourds (par exemple Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), les principaux anions et cations (par exemple Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), les pesticides (par exemple le total des organophosphorés et le total des organochlorés), le carbone organique total et les solides en suspension, par exemple tous les trois mois si on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. S'il a été prouvé que la qualité de l'eau de dilution est demeurée constante pendant au moins un an, les déterminations peuvent être espacées et avoir lieu, par exemple, tous les six mois).

La teneur naturelle de l'eau de dilution en particules et en carbone organique total est aussi basse que possible pour éviter l'adsorption de la substance d'essai sur la matière organique, ce qui réduirait sa biodisponibilité et conduirait à sous-estimer le FBC. La valeur maximale acceptable s'élève à 5 mg/l pour les matières particulaires (matière sèche retenue par un filtre de 0,45 μm) et à 2 mg/l pour le carbone organique total (voir appendice 2). Au besoin, l'eau de dilution est filtrée avant utilisation. Il convient que la contribution des excreta des poissons testés et des résidus alimentaires à la teneur en carbone organique de l'eau d'essai soit aussi faible que possible (voir paragraphe 46).

Solutions d'essai

On préparera une solution mère de la substance d'essai à la concentration appropriée. Il vaut mieux préparer la solution mère par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Une autre option adaptée dans certains cas consiste à utiliser un système de dosage de désorption de la phase solide. Il est généralement déconseillé de recourir à des solvants et à des dispersants (agents solubilisants) [voir (25)]; néanmoins, l'utilisation de ces produits peut être acceptable pour obtenir une solution mère à la concentration appropriée, mais il convient de s'efforcer d'y recourir aussi peu que possible et de ne pas dépasser leur concentration micellaire critique (le cas échéant). Les solvants qui peuvent être utilisés sont l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol; les dispersants qui ont été utilisés sont le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et l'HCO-40. Il convient que la concentration de solvant dans le milieu d'essai final soit la même dans tous les traitements (indépendamment de la concentration de la substance) et n'excède pas les niveaux de toxicité définis pour le solvant dans les conditions d'essai. La concentration maximale est de 100 mg/l (ou 0,1 ml/l). Il est peu probable qu'une concentration de solvant de 100 mg/l modifie beaucoup la concentration maximale de substance d'essai dissoute pouvant être obtenue dans le milieu d'essai (25). Il convient que la contribution du solvant et celle de la substance d'essai à la teneur en carbone organique total de l'eau de l'essai soient connues. Tout au long de l'essai, la concentration du carbone organique total dans les récipients d'essai ne devra pas dépasser la concentration du carbone organique provenant de la substance d'essai et, le cas échéant, du solvant ou du solubilisant⁽²⁾, de plus de 10 mg/l (± 20 %). La teneur en matières organiques peut avoir un effet

⁽¹⁾ Le COT comprend le carbone organique particulaire et le carbone organique dissous. En d'autres termes, $\text{COT} = \text{COP} + \text{COD}$.

⁽²⁾ Bien que ce ne soit généralement pas recommandé, si un solvant ou un agent solubilisant est utilisé, le carbone organique en provenant est ajouté à celui issu de la substance d'essai pour évaluer la concentration en carbone organique dans les récipients d'essai.

important sur le volume de substance d'essai dissoute dans les essais dynamiques, en particulier pour les substances très lipophiles. La microextraction en phase solide (voir paragraphe 60) peut fournir des informations importantes sur le ratio entre composés liés et dissous libres, ces derniers étant considérés comme la fraction biodisponible. Il convient que la concentration de la substance d'essai soit inférieure à la limite de solubilité de cette substance dans le milieu d'essai malgré l'utilisation d'un solvant ou d'un solubilisant. Des précautions s'imposent lors de l'utilisation de solvants facilement biodégradables, ceux-ci pouvant poser des problèmes de prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. S'il n'est pas possible de préparer une solution mère sans recourir à un agent solubilisant, il convient d'évaluer l'intérêt d'un essai par exposition en milieu aquatique par rapport à un essai par voie alimentaire.

Les essais dynamiques demandent un système capable de fournir et de diluer continuellement une solution mère de la substance d'essai (par exemple une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation) ou un système de dosage de désorption de la phase solide, afin d'obtenir la concentration voulue dans les enceintes d'essai. Le volume sera remplacé de préférence cinq fois par jour dans chaque chambre d'essai. Le régime dynamique est préférable, mais lorsqu'il ne sera pas possible de l'instaurer (par exemple lorsque cela porte préjudice aux organismes testés), une technique semi-statique peut être utilisée à condition de respecter les critères de validité (voir paragraphe 24). Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution sont vérifiés 48 heures avant l'essai et au moins une fois par jour pendant l'essai. Au cours de cette vérification, il faudra déterminer le débit dans chaque enceinte d'essai et veiller à ce que sa variation n'excède pas 20 % au sein des enceintes et entre les enceintes.

Sélection des espèces

Les critères importants dans la sélection des espèces sont leur disponibilité immédiate, leur taille adéquate et le fait qu'elles supportent bien les conditions du laboratoire. D'autres critères orientent la sélection des espèces de poissons, comme leur importance récréative, commerciale et écologique ainsi que leur sensibilité comparable, les bons résultats qu'elles ont donnés précédemment, etc. Des espèces recommandées pour les essais sont énumérées à l'appendice 3. D'autres espèces peuvent être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté pour que l'essai se déroule dans des conditions appropriées. Dans ce cas, il convient de justifier le choix de l'espèce et d'exposer la méthode expérimentale. En général, l'utilisation de petites espèces réduira le délai d'établissement du régime stationnaire, mais un plus grand nombre de poissons (prélèvements) peut être nécessaire pour analyser correctement la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai dans les poissons. En outre, des différences de fréquence respiratoire et de métabolisme entre les poissons jeunes et les poissons plus âgés peuvent empêcher les comparaisons entre essais et entre espèces. Pratiquer l'essai sur des poissons à un stade précoce de leur vie (juvéniles) en croissance rapide peut compliquer l'interprétation des données.

Conditions de vie des poissons en laboratoire (pertinentes pour les expositions via le milieu aquatique et par voie alimentaire)

Le stock de poissons est acclimaté dans l'eau pendant au moins deux semaines (voir paragraphe 28) à la température de l'essai et être suffisamment nourri pendant toute cette période (voir paragraphe 45). L'eau et le régime alimentaire sont du même type que ceux qu'on utilisera durant l'essai.

Après une période d'adaptation de 48 heures, on enregistre la mortalité et on applique les critères suivants:

- Si la mortalité est supérieure à 10 % de la population en sept jours: on rejette la totalité du lot;
- Si la mortalité est comprise entre 5 et 10 % de la population en sept jours: on acclimate les organismes pendant sept jours supplémentaires (si la mortalité de la deuxième semaine dépasse 5 %, on rejette la totalité du lot);
- Si la mortalité est inférieure à 5 % de la population en sept jours: on accepte le lot.

On s'assurera que les poissons utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies ou d'anomalies observables. Tous les poissons malades seront éliminés. Il convient de ne pas traiter les poissons pour une maladie durant les deux semaines qui précèdent l'essai ou pendant l'essai

DEROULEMENT DE L'ESSAI

Essai préliminaire

Il peut être utile de conduire un essai préliminaire pour optimiser les conditions expérimentales de l'essai définitif, par exemple du point de vue de la sélection de la (des) concentration(s) de la substance d'essai. L'essai préliminaire est conçu de façon à obtenir les informations requises. On peut ainsi examiner si un essai réduit peut suffire à obtenir un FBC ou si une étude complète est requise (voir les paragraphes 83 à 95 sur l'essai réduit).

Conditions d'exposition*Durée de la phase d'absorption*

La durée de la phase d'absorption peut être prédite expérimentalement (par exemple à partir d'une étude précédente ou d'une étude d'accumulation portant sur une substance de structure voisine) ou d'après certaines relations empiriques qui exploitent la connaissance que l'on a du coefficient de partage n-octanol/eau ou de l'hydrosolubilité de la substance d'essai (à condition que l'absorption soit régie par une cinétique du premier ordre, voir appendice 5).

La phase d'absorption dure 28 jours, sauf s'il est démontré que l'état stationnaire a été atteint plus tôt (voir définitions et unités à l'appendice 1). La courbe de la concentration de la substance d'essai dans le poisson (C_p) en fonction du temps atteint un état stationnaire lorsqu'elle devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_p , réalisées sur des échantillons prélevés à au moins deux jours d'intervalle, ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'il n'y a pas d'augmentation nette de C_p dans le temps entre la première et la dernière analyse successive. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins quatre analyses successives. Pour les substances d'essai qui sont absorbées lentement, il serait plus approprié de prendre des intervalles de sept jours. Si l'état stationnaire n'a pas été atteint en 28 jours, il convient soit de calculer le FBC par la méthode cinétique seule, qui ne dépend pas de l'établissement du régime stationnaire, soit de prolonger la phase d'absorption, en poursuivant les mesures, jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint ou jusqu'à 60 jours, suivant ce qui est le plus rapide. En outre, il convient que la concentration de la substance d'essai dans le poisson à la fin de la période d'absorption soit suffisamment élevée pour permettre une estimation fiable de la constante k_2 lors de la phase d'élimination. Si aucune absorption significative n'est constatée après 28 jours, l'essai peut être arrêté.

Durée de la phase d'élimination

Pour les substances régies par une cinétique du premier ordre, une période égale à la moitié de la phase d'absorption suffit généralement à entraîner une diminution appropriée (par exemple 95 %) de la charge corporelle de la substance d'essai (voir appendice 5 pour une explication de l'estimation). Si le temps requis pour obtenir une élimination de 95 % est trop long dans la pratique et qu'il excède, par exemple, le double de la durée normale de la phase d'absorption (c'est-à-dire plus de 56 jours), on peut appliquer une période plus courte (jusqu'à ce que la concentration de la substance d'essai soit inférieure à 10 % de la concentration à l'état stationnaire, par exemple). Néanmoins, une phase d'élimination plus longue peut être nécessaire pour les substances dont l'absorption et l'élimination suivent des lois plus complexes que celles qui sont représentées par le modèle à compartiment unique pour les poissons, qui obéit à une cinétique du premier ordre. Si on observe de tels phénomènes et/ou si on s'attend à les observer, il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien et/ou à un pharmacocinéticien pour garantir un bon dispositif d'essai. Lorsque la phase d'élimination est prolongée, le nombre de poissons à prélever peut devenir un obstacle et les différences dans la croissance des poissons peuvent influencer les résultats. La durée de la phase dépendra également de la période durant laquelle la concentration de la substance d'essai dans les poissons reste supérieure à la limite analytique de quantification.

Nombre de poissons testés

Le nombre de poissons par concentration d'essai est choisi de manière à ce que les échantillons comportent au moins quatre poissons à chaque temps d'échantillonnage. Les poissons ne sont regroupés que si l'analyse d'un seul poisson n'est pas praticable. Si on souhaite une plus grande précision dans l'ajustement des courbes (et dans les paramètres dérivés) ou si des études de métabolisme sont requises (par exemple pour faire la distinction entre les métabolites et la substance mère quand on utilise des substances marquées à la radioactivité), il faut un plus grand nombre de poissons par temps d'échantillonnage. La teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai sont déterminées sur le même matériel biologique. Si ce n'est pas faisable, des poissons supplémentaires peuvent être nécessaires (voir paragraphes 56 et 57).

Si l'on utilise des poissons adultes (c'est-à-dire sexuellement matures), il convient qu'ils ne soient pas en période de frai pendant l'essai ou qu'ils n'aient pas récemment frayé. Il faut aussi préciser s'il s'agit de mâles ou de femelles, ou des deux. Si les deux sexes sont utilisés, il convient de démontrer qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux sexes du point de vue de la croissance et de la teneur en lipides avant le début de l'exposition, en particulier si on prévoit que le regroupement de mâles et de femelles sera nécessaire pour obtenir des concentrations détectables de la substance et/ou la teneur en lipides.

Dans tous les essais, il convient de choisir des poissons de poids voisin de telle sorte que le poids des plus petits ne soit pas inférieur aux deux tiers du poids des plus gros. Il convient qu'ils soient tous de la même année et proviennent de la même source. Le poids et l'âge d'un poisson pouvant avoir une incidence importante sur le FBC (12), il y a lieu de consigner ces détails avec précision. On recommande de peser un sous-échantillon du stock de poissons peu de temps avant l'essai, afin d'estimer le poids moyen (voir paragraphe 61).

Taux de charge

On appliquera des rapports élevés du volume d'eau au poids des poissons afin de minimiser la réduction de la concentration du composé d'essai dans l'eau provoquée par l'introduction des poissons au début de l'essai et d'éviter une diminution de la concentration de l'oxygène dissous. Il est important d'adapter le taux de charge à l'espèce de poisson. Quoi qu'il en soit, on recommande normalement un taux de charge de 0,1-1,0 g de poissons (poids frais) par litre d'eau et par jour. Des taux de charge plus élevés peuvent être pratiqués, s'il a été prouvé que la concentration requise de la substance d'essai peut être maintenue à ± 20 % près et que la concentration de l'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la saturation (voir paragraphe 24).

L'habitat naturel du poisson guide le choix du régime de charge. Les espèces benthiques, par exemple, peuvent avoir besoin d'un aquarium doté d'un plus grand fond pour le même volume d'eau que les espèces pélagiques.

Alimentation

Pendant les périodes d'acclimatation et d'essai, les poissons recevront une alimentation appropriée, dont la teneur en lipides et en protéines totales est connue, en quantité suffisante pour être en bonne santé et conserver leur poids (une certaine croissance est permise). Il convient de les nourrir quotidiennement pendant les périodes d'acclimatation et d'essai suivant un dosage qui est fonction de l'espèce utilisée, des conditions expérimentales et de la valeur calorique des aliments (par exemple pour la truite, un dosage approximatif de 1 à 2 % du poids corporel par jour). La ration alimentaire est définie de manière à éviter un développement rapide et une forte augmentation de la teneur en lipides. Pour maintenir une ration stable, le volume de nourriture est recalculé s'il y a lieu, par exemple une fois par semaine. Pour ce calcul, le poids des poissons de chaque chambre d'essai peut être estimé à partir du poids des derniers poissons prélevés dans cette chambre. Il ne faut pas peser les poissons qui restent dans la chambre.

Dans les chambres d'essai, les aliments non consommés et les excréments seront siphonnés chaque jour, peu après l'alimentation (de 30 minutes à une heure après celle-ci). Il convient que les chambres restent aussi propres que possible tout au long de l'essai, pour maintenir la concentration de matières organiques aussi basse que possible (voir paragraphe 29), la présence de carbone organique pouvant limiter la biodisponibilité de la substance d'essai (12).

Comme beaucoup d'aliments sont à base de farine de poissons, il convient de veiller à ce qu'ils n'influencent pas les résultats de l'essai ou n'induisent pas d'effets négatifs, par exemple en contenant des (traces de) pesticides, de métaux lourds et/ou de la substance d'essai elle-même.

Lumière et température

Une photopériode de 12 à 16 heures est recommandée et il convient que la température (± 2 °C) soit adaptée à l'espèce testée (voir appendice 3). Il convient de connaître le type et les caractéristiques de l'illumination. Il convient de faire attention à une éventuelle phototransformation de la substance d'essai dans les conditions d'irradiation appropriée afin d'éviter d'exposer les poissons à des produits de photodégradation. Dans certains cas, il suffit d'utiliser un filtre pour éliminer les radiations ultra-violet inférieures à 290 nm.

Concentrations d'essai

Cet essai a tout d'abord été conçu pour les substances organiques non polaires. Pour ce type de produit, l'exposition d'un poisson à une concentration unique devrait être suffisante, puisqu'on n'attend pas d'effet de concentration, bien que le cadre réglementaire en vigueur puisse exiger deux concentrations. Si on teste d'autres types de substances, ou s'il existe d'autres indications de dépendance éventuelle à la concentration, l'essai est réalisé avec deux concentrations ou plus. Si on ne teste qu'une concentration, il convient de justifier le choix de cette concentration (voir paragraphe 79). En outre, il convient que la concentration testée soit aussi basse qu'il est pratiquement et techniquement faisable (autrement dit, elle n'approche pas la limite de solubilité).

Dans certains cas on peut s'attendre à ce que la bioconcentration d'une substance dépende de sa concentration dans l'eau (par exemple pour les métaux, pour lesquels l'absorption par les poissons peut être au moins en partie régulée). Dans des cas de ce type, il peut être nécessaire de tester au moins deux concentrations, et si possible plus (voir paragraphe 49) pertinentes d'un point de vue environnemental. De plus, pour les substances pour lesquelles les concentrations testées doivent, pour des raisons pratiques, se rapprocher de la limite de solubilité, il est recommandé de tester au moins deux concentrations, ce qui peut donner une idée de la fiabilité des concentrations d'exposition. Parmi les concentrations d'essai figurent la concentration réaliste sur le plan environnemental ainsi que celle pertinente pour l'objet spécifique de l'évaluation.

Il convient que la ou les concentrations de la substance d'essai soient inférieures au niveau auquel elles produisent un effet chronique ou à 1 % de la CL_{50} aiguë asymptotique, s'inscrivent dans une fourchette pertinente du point de vue de l'environnement et soient supérieures d'au moins une puissance dix à la limite de quantification dans l'eau par la méthode d'analyse utilisée. La concentration d'essai la plus élevée admise peut être déterminée en divisant la CL_{50} aiguë (96 h) par un rapport aigu/chronique (par exemple des rapports adéquats pour certaines substances chimiques se situent autour de 3, mais quelques-uns sont au-dessus de 100). Si une seconde concentration est utilisée, il convient qu'elle diffère de la première d'un facteur dix. Si ce n'est pas possible en raison du critère de toxicité (qui plafonne la concentration d'essai) et du seuil de détection analytique, il convient d'envisager d'appliquer un facteur inférieur à 10 et d'utiliser une substance d'essai marquée à la radioactivité (de la pureté la plus élevée, de préférence supérieure à 98 %). Il convient de veiller à ce que la concentration de la substance d'essai ne dépasse pas sa solubilité dans le milieu d'essai.

Témoins

Un groupe témoin traité avec de l'eau de dilution ou, le cas échéant, (voir paragraphes 30 et 31), avec le solvant est testé parallèlement aux groupes traités avec la substance d'essai.

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le carbone organique total, le pH et la température sont mesurés dans tous les récipients d'essai et témoins. La dureté totale et la salinité (le cas échéant) sont mesurées dans le(s) groupe(s) témoin (s) et dans le récipient. Si au moins deux concentrations sont testées, il convient de mesurer ces paramètres à la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité (le cas échéant) sont mesurés au moins trois fois pendant la période d'absorption (au début, vers le milieu et à la fin) et au moins une fois par semaine pendant la période d'élimination. Le carbone organique total est mesuré au début de l'essai (24 h et 48 h avant le début de la phase d'absorption) avant l'introduction des poissons et au moins une fois par semaine pendant les phases d'absorption et d'élimination. La température devrait être mesurée et enregistrée quotidiennement, le pH au début et à la fin de chaque période et la dureté une fois au cours de l'essai. La température est de préférence mesurée en continu dans au moins un récipient.

Prélèvement et analyse des poissons et de l'eau

Programme de prélèvement des poissons et de l'eau

On prélèvera de l'eau dans les chambres d'essai afin de déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des poissons et pendant les phases d'absorption et d'élimination. L'eau est prélevée en même temps que les poissons et avant leur alimentation. Des prélèvements plus fréquents peuvent être utiles pour garantir la stabilité des concentrations après l'introduction des poissons. Il convient de déterminer les concentrations de la substance d'essai pendant la phase d'absorption pour vérifier si les critères de validité ont été respectés (paragraphe 24). Si l'analyse de l'eau prélevée au début de la phase d'élimination ne détecte pas de substance d'essai, cela peut justifier de ne plus rechercher la présence de cette substance dans l'eau d'essai et l'eau témoin pour le restant de la phase d'élimination.

Les poissons seront prélevés au moins cinq fois pendant la phase d'absorption et au moins quatre fois pendant la phase d'élimination de la substance d'essai. Comme dans certains cas il sera difficile de calculer une estimation raisonnablement précise du FBC avec ce nombre d'échantillons (en particulier lorsque l'absorption et l'élimination n'obéiront pas à une simple cinétique du premier ordre), il peut se justifier de prélever des échantillons plus fréquemment au cours des deux périodes (voir appendice 4).

La teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai sont déterminées sur le même matériel biologique au moins au début et à la fin de la phase d'élimination. Si ce n'est pas praticable, au moins trois poissons devront être prélevés pour déterminer leur teneur en lipides à chacun des trois mêmes temps d'échantillonnage. Il faudra ajuster en conséquence le nombre de poissons par récipient au début de l'expérience ⁽¹⁾. Sinon, si on ne détecte pas un volume important de substance d'essai dans les poissons témoins (c'est-à-dire les poissons du stock), les poissons témoins de l'essai peuvent n'être analysés que pour leur teneur en lipides, et l'analyse de la substance d'essai dans le ou les groupes d'essai (ainsi que la constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination et le FBC associés) peut être corrigée en fonction de la teneur en lipides du groupe témoin au cours de l'essai ⁽²⁾.

Les poissons morts ou malades ne sont pas analysés à la recherche d'une concentration de la substance d'essai ou de leur teneur en lipides.

Un exemple de programme de prélèvement acceptable est donné à l'appendice 4. D'autres programmes peuvent être établis facilement d'après d'autres valeurs supposées du K_{OE} qui permettent de calculer le temps d'exposition correspondant à une absorption de 95 % (se reporter à l'appendice 5 pour les calculs).

Pendant la phase d'absorption, les prélèvements se poursuivent jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (voir définitions et unités à l'appendice 1) ou que la phase d'absorption s'achève (après 28 ou 60 jours, voir paragraphes 37 et 38). Avant d'entamer la phase d'élimination, il convient de transférer les poissons dans des récipients propres.

Prélèvement et préparation des échantillons

On prélèvera les échantillons d'eau à analyser par exemple en siphonnant à travers un tube inerte à partir d'un point central de l'enceinte d'essai. La centrifugation ou la filtration ne réussissent pas toujours à séparer les fractions biodisponible et non biodisponible de la substance d'essai. Si on recourt à une technique de séparation, il convient de la justifier ou de la valider dans le rapport d'essai, compte tenu des difficultés de biodisponibilité (25). Les prélèvements de substances très hydrophobes, en particulier (c'est-à-dire dont le $\log K_{OE}$ est inférieur à 5) (12) (26), pour lesquels une adsorption vers le filtre ou vers les récipients de centrifugation peut survenir, ne sont pas soumis à ces traitements. En revanche, il convient de s'efforcer de maintenir la plus grande propreté dans les aquariums (voir paragraphe 46) et de suivre la teneur en carbone organique totale pendant les phases d'absorption et d'élimination (voir paragraphe 53). Pour éviter les problèmes potentiels dus à la réduction de la biodisponibilité, on peut réaliser, pour les substances faiblement solubles et très hydrophobes, des prélèvements par techniques de microextraction en phase solide.

⁽¹⁾ Si la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai ne sont pas mesurées sur le même poisson, les poissons utilisés ont au moins un poids similaire et (si approprié) être du même sexe.

⁽²⁾ Cette solution alternative n'est valable que si les poissons de tous les groupes d'essai sont répartis en groupes de taille similaire, prélevés selon la même méthode et nourris de manière identique. Cela garantit que la croissance des poissons est la même dans tous les groupes d'essai, si la concentration testée est inférieure au seuil toxique. Si la croissance est similaire, la teneur en lipides devrait l'être aussi. Une différence de croissance dans le groupe témoin indiquerait un effet de la substance et invaliderait l'essai.

Il convient d'euthanasier instantanément les poissons prélevés, suivant la méthode la plus appropriée et la moins cruelle (pour des mesures sur des poissons entiers, il suffit de rincer ceux-ci à l'eau (voir paragraphe 28) et de les sécher en surface). Il convient ensuite de peser les poissons et de mesurer leur longueur totale ⁽¹⁾. Pour chaque poisson, le poids et la longueur mesurés sont reliés à la concentration de la substance analysée (et s'il y a lieu à la teneur en lipides), par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé.

Il est préférable d'analyser les poissons et l'eau immédiatement après les avoir prélevés pour éviter les dégradations ou d'autres pertes et de calculer des constantes d'absorption et d'élimination approximatives pendant le déroulement de l'essai. En procédant à une analyse immédiate, on évite aussi de retarder la détermination du moment où le plateau (état stationnaire) a été atteint.

À défaut de pouvoir pratiquer une analyse immédiate, on stockera les échantillons selon une méthode appropriée. Avant de commencer l'étude, on se renseignera sur la méthode de stockage adaptée à la substance d'essai, par exemple la congélation, la conservation à 4 °C, l'extraction, etc. La durée de stockage est choisie de façon à ce que la substance chimique ne se dégrade pas pendant le stockage.

Qualité de la méthode d'analyse

Comme toute la procédure est essentiellement subordonnée à la fiabilité, la précision et la sensibilité de la méthode d'analyse appliquée à la substance d'essai, il convient de vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique ainsi que l'isolement de la substance d'essai à partir de l'eau et du poisson sont satisfaisants pour la méthode en question. Ces vérifications s'effectuent au cours des essais préliminaires. Il convient de s'assurer également que la substance d'essai n'est pas détectable dans l'eau de dilution utilisée. Il faudra, au besoin, corriger les valeurs de la concentration de la substance d'essai dans l'eau et dans les poissons en fonction des valeurs fournies par les témoins pour l'isolement de la substance d'essai et sa concentration naturelle. Les échantillons d'eau et de poisson sont manipulés avec soin tout au long de l'essai de manière à minimiser la contamination et les pertes (provoquées par l'adsorption sur l'instrument de prélèvement, par exemple).

Analyse des échantillons de poissons

Si on utilise du matériel marqué pendant l'essai, il est possible d'analyser la radioactivité totale (c'est-à-dire celle de la substance parente et des métabolites) ou de purifier les échantillons pour analyser la substance parente séparément. Si le FBC doit s'appuyer sur la substance parente, les principaux métabolites sont caractérisés, au minimum à la fin de la phase d'absorption (voir paragraphe 6). Les principaux métabolites sont ceux qui représentent au moins 10 % des résidus totaux présents dans les tissus des poissons, ceux qui en représentent au moins 5 % à deux temps d'échantillonnage consécutifs, ceux en hausse tout au long de la phase d'absorption, enfin, ceux dont on sait qu'ils posent des problèmes toxicologiques. Si le FBC pour l'ensemble du poisson, en termes de résidus radiomarqués totaux, est supérieur ou égal à 500, il peut être conseillé, et même fortement recommandé dans le cas de certaines substances chimiques comme les pesticides — d'identifier et de quantifier les principaux métabolites. La quantification de ces métabolites peut être exigée par certaines autorités réglementaires. Si les produits de dégradation représentant 10 % ou plus (> 10 %) des résidus radioactifs totaux dans les poissons sont identifiés et quantifiés, il est alors aussi recommandé d'identifier et de quantifier les produits de dégradation dans l'eau d'essai. Si ce n'est pas praticable, il y a lieu de l'expliquer dans le rapport.

La concentration de la substance d'essai est habituellement déterminée pour chaque poisson pesé individuellement. Si cela est impossible, on peut regrouper les échantillons d'un même prélèvement, mais cette opération limite le traitement statistique applicable aux résultats, aussi y a-t-il lieu d'inclure un nombre suffisant de poissons dans l'essai pour que le regroupement, la procédure et la précision voulus soient possibles. Les références (27) et (28) peuvent servir d'introduction sur les procédures de regroupement adaptées.

⁽¹⁾ Outre le poids, la longueur totale est enregistrée car l'augmentation de cette longueur au cours de l'essai est un bon indicateur de la survenue d'un éventuel effet négatif.

Il convient d'exprimer le FBC de façon normalisée rapportée à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % (par rapport à son poids frais), outre le FBC obtenu directement de l'essai (voir paragraphe 21), à moins de pouvoir démontrer que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides. Il faut, si possible, déterminer la teneur en lipides des poissons à chaque prélèvement, de préférence à partir du même extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie. Néanmoins, l'analyse des substances d'essai nécessite souvent des procédures d'extraction spécifiques, qui peuvent être en contradiction avec les lignes directrices concernant la détermination des lipides. Dans ce cas (jusqu'à ce que des méthodes instrumentales non destructives adaptées soient disponibles), il est recommandé d'employer une stratégie différente pour déterminer la teneur en lipides des poissons (voir paragraphe 56). Les lipides sont déterminés suivant les méthodes appropriées (20). On recommande (30) habituellement la technique d'extraction chloroforme/méthanol (29), mais la méthode de Smedes (31) peut également être utilisée. Elle présente la même efficacité d'extraction, une grande précision, utilise moins de solvants organiques toxiques et facilite la performance. D'autres méthodes dont la précision soutient la comparaison avec les méthodes recommandées peuvent être utilisées, à condition de justifier correctement leur choix. Il est important de donner des détails sur la méthode mise en œuvre.

Mesure du développement des poissons

Au début de l'essai, il convient de peser et de mesurer un à un cinq à dix poissons du stock. Il peut s'agir des mêmes poissons utilisés pour l'analyse lipidique (voir paragraphe 56). Il convient de mesurer le poids et la longueur des poissons issus des groupes d'essai et témoins utilisés pour chaque échantillonnage avant de procéder à leur analyse chimique ou lipidique. Ces mesures peuvent servir à estimer le poids et la longueur des poissons restant dans les récipients d'essai et témoins (voir paragraphe 45).

RAPPORT D'ESSAI ET RÉSULTATS

Traitement des résultats

On tracera la courbe de l'absorption de la substance d'essai en portant sur un diagramme arithmétique sa concentration dans/sur le poisson (ou dans des tissus spécifiés) pendant la phase d'absorption en fonction du temps. Si la courbe atteint un plateau, autrement dit si elle devient approximativement asymptotique par rapport à l'axe du temps, on calcule le FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{C_p \text{ à l'état stationnaire (moyenne)}}{C_e \text{ à l'état stationnaire (moyenne)}}$$

Le développement de C_p peut être influencé par la croissance des poissons (voir paragraphes 72 et 73). La concentration moyenne d'exposition (C_e) est influencée par la variation dans le temps. On peut s'attendre à ce qu'une concentration moyenne pondérée par rapport au temps soit plus pertinente, même si la variation s'inscrit dans les limites de la fourchette de validité (voir paragraphe 24). Une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau peut être calculée en suivant les instructions données à l'appendice 5, section 1

Il y a lieu de déterminer le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) en calculant le ratio k_1/k_2 , k_1 et k_2 étant les deux constantes cinétiques du premier ordre. Les constantes cinétiques k_1 et k_2 et le FBC_k peuvent être déduits en évaluant simultanément la phase d'absorption et la phase d'élimination. Une autre solution consiste à déterminer k_1 et k_2 l'un après l'autre (voir l'appendice 5 qui décrit et compare ces méthodes). La constante d'élimination (k_2) peut devoir être corrigée de l'effet de dilution par la croissance (voir paragraphes 72 et 73). Si la courbe d'absorption et/ou d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, il convient d'employer des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'appendice 5) et de demander conseil à un biostatisticien et/ou à un pharmacocinéticien.

Poids et longueur des poissons

Le poids frais et la longueur totale de chaque poisson, à chaque temps d'échantillonnage, sont présentés séparément pour les groupes d'essai et les groupes témoins pendant les phases d'absorption et d'élimination (y compris les poissons du stock au début de la période d'absorption). Pour chaque poisson, le poids et la longueur sont reliés à la concentration chimique analysée, par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé. Le poids est la mesure du développement à privilégier afin de corriger le FBC cinétique de l'effet de dilution par la croissance. Le paragraphe 73 et l'appendice 5 présentent la méthode utilisée pour cette correction.

Correction de la dilution par la croissance et normalisation des lipides

Le développement des poissons pendant la phase d'élimination peut réduire les concentrations chimiques mesurées chez eux, ce qui augmente la constante cinétique d'élimination globale (k_2) par rapport à ce que provoqueraient les processus d'élimination seuls (par exemple respiration, métabolisme, égestion). Les facteurs de bioconcentration cinétique sont corrigés de la dilution par la croissance. Le FBC_{ES} est aussi influencé par la croissance, mais il n'existe aucune procédure de correction convenue en la matière. Dans les cas de croissance importante, le FBC_k corrigé de la croissance (FBC_{k_g}) est aussi calculé car il peut s'avérer plus pertinent. La teneur en lipides des poissons d'essai (fortement associée à la bioaccumulation des substances hydrophobes) peut suffisamment varier dans la pratique pour qu'une normalisation rapportée à une teneur en lipides prédéfinie (5 % du poids frais) soit nécessaire pour obtenir des facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire qui aient un sens — sauf si l'on peut démontrer que la substance ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides (par exemple certaines substances perfluorées peuvent se lier aux protéines). L'appendice 5 présente les équations et donne des exemples de calculs de ce type.

Pour corriger un FBC cinétique de la dilution par la croissance, il convient de corriger la constante cinétique d'élimination de la croissance. Cette constante cinétique d'élimination corrigée (k_{2g}) s'obtient en soustrayant la constante cinétique de croissance (k_g , déduite du poids mesuré) de la constante cinétique d'élimination globale (k_2). Le facteur de bioconcentration cinétique corrigé de la croissance se calcule alors en divisant la constante cinétique d'absorption (k_1) par la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}) (voir appendice 5). Dans certains cas, cette méthode est inadaptée. Par exemple, pour des substances s'éliminant très lentement testées chez des poissons à croissance rapide, la k_{2g} obtenue peut être très faible, aussi toute erreur commise dans les deux constantes cinétiques servant à la calculer est-elle cruciale, et dans certains cas la k_g estimée peut être supérieure à k_2 . Une autre méthode contournant la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance consiste à utiliser le poids de substance d'essai par poisson (entier) lors de l'élimination plutôt que le poids de substance par unité de masse du poisson (concentration). Ce calcul est facile à faire, car dans le cadre d'essais respectant cette méthode d'essai, on associe les concentrations tissulaires aux poids individuels des poissons. L'appendice 5 présente la procédure de calcul simple. Il convient de souligner que le recours à cette méthode alternative n'empêche pas qu'il faille consigner la valeur de k_2 .

Les facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire sont aussi être consignés, rapportés à une teneur en lipides par défaut de 5 % (du poids frais du poisson), sauf si l'on peut prouver que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides. Les données relatives à la concentration dans le poisson, ou le FBC, sont normalisées en fonction du ratio entre ces 5 % et la teneur réelle moyenne en lipides d'un poisson (en pourcentage de son poids frais) (voir appendice 5).

Si l'analyse chimique et l'analyse lipidique ont été menées sur le même poisson, il convient d'utiliser ces données lipidiques individuelles normalisées pour calculer un FBC normalisé par rapport aux lipides. Autre possibilité, si la croissance des poissons est similaire dans les groupes exposés et les groupes témoins, on peut n'utiliser que la teneur en lipides des poissons témoins pour la correction en fonction des lipides (voir paragraphe 56). L'appendice 5 décrit une méthode de calcul du FBC normalisé par rapport aux lipides.

Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque les valeurs mesurées de la concentration des solutions d'essai avoisinent le seuil de détection de la méthode d'analyse.

La croissance moyenne dans le groupe d'essai et celle dans le groupe témoin en principe ne diffèrent pas beaucoup afin d'exclure les effets toxiques. Les constantes cinétiques de croissance ou les courbes de croissance des deux groupes sont comparées au moyen d'une procédure adaptée ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ On peut réaliser un test t sur les constantes cinétiques de croissance, pour tester si le développement entre les groupes témoins et d'essai varie, ou test F en cas d'analyse des écarts. Si besoin, on peut recourir à un test F ou à un essai fondé sur les rapports de probabilité pour faciliter le choix du modèle de croissance approprié [monographie OCDE n° 54 (32)].

Des courbes d'absorption et d'élimination clairement définies attestent que les résultats concernant la bioconcentration sont de bonne qualité. S'agissant des constantes cinétiques, il convient que le test du χ^2 constate un bon ajustement du modèle de bioaccumulation [à savoir un faible pourcentage d'erreur dans les mesures (32)] pour que les constantes puissent être considérées comme fiables (voir appendice 5). Si on utilise plus d'une concentration d'essai, il convient que la variation des constantes d'élimination et d'absorption entre les concentrations d'essai soit inférieure à 20 % ⁽¹⁾. Sinon, la dépendance à la concentration peut être indiquée. L'observation de différences significatives entre les vitesses d'absorption ou d'élimination mesurées aux diverses concentrations d'essai est signalée et donne lieu à des explications possibles. En général, si l'étude a été bien conçue, le seuil de confiance du FBC à 95 % tourne autour de 20 % du FBC obtenu.

Si on teste deux concentrations ou plus, les chiffres obtenus à toutes ces concentrations servent à étudier la cohérence des résultats et à mettre en évidence une éventuelle dépendance à la concentration. Si une seule concentration est testée afin de réduire le nombre d'animaux et/ou les ressources utilisés, il y a lieu de justifier ce choix.

Le FBC calculé est incertain si le FBC_k est nettement supérieur au FBC_{ES} , car cela peut indiquer que l'état stationnaire n'a pas été atteint ou que la dilution par la croissance et les processus de pertes n'ont pas été pris en compte. Dans les cas où le FBC_{ES} est très supérieur au FBC_k , le calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination est vérifié. Une procédure de validation de l'ajustement différente peut améliorer l'estimation du FBC_k (voir appendice 5).

Rapport d'essai

Outre les informations sur la substance d'essai énumérées au paragraphe 3, le rapport d'essai comporte les renseignements suivants:

Substance d'essai

État physique et, si nécessaire, propriétés physico-chimiques;

- identité chimique, par exemple nom CAS/UICPA, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés le cas échéant et si c'était faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).
- pour les substances multicomposants et UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexe et matières biologiques) il y a lieu de décrire avec autant de précision que possible l'identité chimique des différents composants, et d'indiquer pour chacun quel pourcentage de la masse totale de la substance il représente. Il convient d'expliquer succinctement pourquoi la méthode d'analyse utilisée permet de mesurer la concentration de la substance, et de décrire toutes les procédures d'analyse en indiquant notamment le degré de précision de la méthode, son seuil de détection et sa limite de quantification.
- en cas de marquage, position précise des atomes marqués et pourcentage de radioactivité lié aux impuretés.
- informations sur la toxicité de la substance d'essai pour le poisson (idéalement l'espèce testée). La toxicité est consignée sous forme de CL50 aiguë (96 h) et de CSEN0 et CMENO tirées d'une étude chronique (essais réalisés soit aux premiers stades de la vie, soit tout au long du cycle de vie, si disponibles).
- conditions de stockage du produit ou de la substance chimique d'essai et, le cas échéant, stabilité du produit ou de la substance chimique d'essai dans les conditions de stockage antérieures.

Espèce testée:

Nom scientifique, souche, origine, pré-traitement éventuel, acclimatation, âge, sexe (s'il y a lieu), taille (poids et longueur), etc.

⁽¹⁾ Ces pourcentages supposent la fiabilité des méthodes d'analyse et une demi-vie inférieure à 14 jours. Si les méthodes d'analyse sont moins fiables ou si la demi-vie est (très) supérieure, les chiffres seront plus élevés.

Conditions expérimentales:

- Procédé d'essai suivi (par exemple, semi-statique ou dynamique); étude complète ou réduite (avec arguments de justification).
- Type et caractéristiques de l'illumination utilisée et photopériode(s).
- Schéma de l'essai (par exemple, nombre et dimension des enceintes d'essai, débit de remplacement de l'eau, taux de charge, nombre de réplicats, nombre de poissons par réplicat, nombre de concentrations différentes utilisées au cours de l'essai, longueur des phases d'absorption et d'élimination, fréquence de prélèvement des échantillons d'eau et de poissons).
- Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solvant, sa concentration et sa contribution à la teneur en carbone organique de l'eau d'essai sont mentionnés, le cas échéant) ou description du système de dosage alternatif.
- Concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode de calcul de ces paramètres et données et fréquence à laquelle ils sont calculés.
- Source de l'eau de dilution, description du traitement préalable éventuel, résultats de la démonstration éventuelle de la capacité des poissons testés à vivre dans cette eau et caractéristiques de celle-ci: pH, dureté, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs en chlore résiduel (si elles ont été mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si justifié) et toute autre mesure effectuée.
- Qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, carbone organique total, température et concentration de l'oxygène dissous; notamment méthodes utilisées et fréquence des mesures.
- Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple, type d'aliment(s), source, composition — si possible, donner au moins les teneurs en lipides et en protéines), ration alimentaire choisie, quantité donnée et fréquence.
- Informations sur le traitement des échantillons de poissons et d'eau, y compris les détails de la préparation, du stockage, de l'extraction et des procédés d'analyse (et leur précision) pour la substance d'essai et la teneur en lipides.
- Méthodes utilisées pour la randomisation des traitements et l'affectation des poissons aux récipients d'essai.
- Date d'introduction des organismes d'essai dans les solutions d'essai et durée de l'essai.
- Description des essais de détermination de l'ordre de grandeur et des résultats obtenus, s'il y a lieu.

Résultats:

- Résultats de l'étude préliminaire éventuelle.
- Mortalité des poissons témoins et des poissons de chaque chambre d'exposition et comportements anormaux éventuels.
- Informations sur les effets nocifs observés.
- Description complète de tous les procédés d'analyse chimique utilisés, y compris les seuils de détection et de quantification, la variabilité et l'isolement.
- Teneur en lipides des poissons, y compris la méthode appliquée, et si déduit le facteur de normalisation des lipides (L_n , facteur pour exprimer les résultats relatifs à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %).
- Tableau des poids (et longueurs), reliés aux concentrations chimiques (et à la teneur en lipides, s'il y a lieu) dans chaque poisson des groupes témoin et d'essai (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et calculs pour les constante(s) cinétique(s) de croissance obtenues.
- Tableau des concentrations de la substance d'essai dans les poissons (C_p , pour chaque poisson) et dans l'eau (C_e) (avec les valeurs moyennes pour les groupes d'essai et témoin, écart-type et fourchette, s'il y a lieu) pour tous les temps de prélèvement (C_p exprimé en mg/kg de poids frais d'un poisson entier ou de tissus spécifiques, par exemple lipidiques, et C_e en mg/l). Valeurs de C_e des séries témoins (tous les éléments à l'appui sont également mentionnés).

- Courbes (incluant toutes les données mesurées), montrant (s'il y a lieu, les concentrations peuvent être exprimées pour l'animal entier ou des tissus spécifiques et la teneur en lipides être normalisée à 5 % de l'animal ou de tissus spécifiques):
 - le développement (soit le poids du poisson en fonction du temps) ou le poids transformé en logarithme naturel en fonction du temps (y compris la constante cinétique de croissance déduite, k_g);
 - l'absorption et l'élimination de la substance d'essai dans le poisson, (sur un graphique);
 - le délai d'établissement du régime stationnaire (si atteint);
 - la concentration transformée en logarithme naturel en fonction du temps d'absorption (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_1);
 - la concentration transformée en logarithme naturel (ln concentration) en fonction du temps d'élimination (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_2); et
 - les deux courbes des phases d'absorption et d'élimination, montrant les données et le modèle ajusté.
- Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur un tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.
- Facteur de bioconcentration à l'état stationnaire, (FBC_{ES}), si l'état stationnaire est (presque) atteint.
- Facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) et constantes cinétiques d'absorption et d'élimination obtenues k_1 et k_2 , avec les écarts de k_2 (pente et ordonnée à l'origine) dans le cas d'un ajustement séquentiel.
- Intervalle de confiance, écart-type (s'il est connu) et méthodes de traitement informatique/d'analyse des données pour chaque paramètre et chaque concentration de la substance d'essai.
 - Toute information concernant les métabolites de la substance chimique radiomarquée et leur accumulation.
 - Constante(s) cinétique(s) de croissance (y compris intervalle(s) de confiance de 95 %) et la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}), la demi-vie et le FBC (FBC_{kg}).
 - Toute anomalie concernant l'essai, tout écart à ces modes opératoires et toute autre information pertinente.
- Un tableau synthétisant les données mesurées et calculées pertinentes, comme ci-après:

| Constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance et facteurs de bioconcentration (FBC) | |
|---|---|
| k_g (constante cinétique de croissance; jour ⁻¹): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| k_1 (constante cinétique globale; l kg ⁻¹ jour ⁻¹): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| k_2 (constante cinétique d'élimination globale; jour ⁻¹): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| k_{2g} (constante cinétique d'élimination globale corrigée de la croissance; jour ⁻¹): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| C_p (concentration de la substance dans le poisson à l'état-stationnaire; mg kg ⁻¹): | Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾ |
| C_e (concentration de la substance dans l'eau à l'état-stationnaire; mg l ⁻¹): | Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾ |
| L_n (facteur de normalisation des lipides): | Insérer la valeur ⁽³⁾ |

| Constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance et facteurs de bioconcentration (FBC) | |
|---|--|
| FBC _{ES} (FBC à l'état stationnaire; l kg ⁻¹): | Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾ |
| FBC _{ESL} (FBC à l'état stationnaire normalisé des lipides; l kg ⁻¹): | Insérer la valeur ⁽³⁾ ± ET ⁽²⁾ |
| FBC _k (FBC cinétique; l kg ⁻¹): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| FBC _{kg} (FBC cinétique corrigé de la croissance; l kg ⁻¹): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| t _{1/2g} (demi-vie corrigée de la croissance; jour): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| FBC _{kl} (FBC cinétique normalisé des lipides; l kg ⁻¹): | Insérer la valeur |
| FBC _{klg} (FBC cinétique normalisé des lipides et corrigé de la croissance; l kg ⁻¹): | Insérer la valeur |
| ⁽¹⁾ IC: intervalle de confiance (quand estimation possible) ⁽²⁾ ET: écart-type (quand estimation possible) | |

Il faut éviter de consigner comme résultat «non détecté/quantifié au seuil de détection/quantification» lors de la mise au point de la méthode avant l'essai et à la conception de l'expérience, puisque ces résultats ne peuvent pas servir à calculer les constantes cinétiques.

C.13 — II: Essai réduit d'exposition des poissons via le milieu aquatique

INTRODUCTION

L'expérience accumulée dans la conduite et l'interprétation de l'essai complet, que ce soit dans les laboratoires ou au sein des organes de réglementation, montre que — à quelques exceptions près — la cinétique du premier ordre s'applique pour estimer les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination. Aussi l'estimation de ces constantes peut-elle se faire avec un minimum de temps d'échantillonnage, et permettre d'obtenir le FBC cinétique.

L'étude d'autres concepts pour analyser le FBC avait pour objectif premier la mise au point d'un petit essai à mettre en œuvre lors d'une étape intermédiaire afin de réfuter ou confirmer les estimations du FBC basées sur K_{oc} et sur les relations structure-activité quantitatives (RSAQ) et se passer ainsi de l'essai complet pour de nombreuses substances chimiques. Il s'agissait aussi de réduire le coût de l'essai et le nombre d'animaux utilisés, en diminuant les prélèvements et les séquences analytiques. Tout en respectant le concept général de la précédente méthode d'essai pour permettre l'intégration des résultats de l'essai aux données existantes sur le FBC et pour améliorer ces résultats et l'interprétation des données, l'objectif était aussi de fournir des estimations du FBC suffisamment précises pour évaluer les risques et prendre les décisions pertinentes. De nombreuses considérations s'appliquent de la même façon que dans l'essai complet, par exemple les critères de validité (voir paragraphe 24) et l'arrêt d'un essai dans le cas où aucune absorption notable n'est observée à l'issue de la phase d'absorption (voir paragraphes 16 et 38).

Les substances pouvant se prêter à ce concept d'essai réduit relèvent du domaine général pour lequel la présente méthode d'essai a été développée, à savoir les substances organiques non polaires (voir paragraphe 49). S'il apparaît que la substance à l'étude se comporte différemment (net écart par rapport à la cinétique du premier ordre, par exemple), il convient, pour respecter la réglementation, de réaliser un essai complet.

En règle générale, l'essai réduit n'est pas réalisé sur une période plus courte que l'essai type concernant le FBC, mais comprend moins de prélèvements de poissons (voir appendice 6 pour l'explication). Néanmoins, la période d'élimination peut être raccourcie pour les substances chimiques à élimination rapide afin d'éviter que les concentrations dans le poisson ne tombent sous le seuil de détection/quantification avant la fin de l'essai. Un essai réduit d'exposition via le milieu aquatique avec une seule concentration, peut servir à déterminer s'il est nécessaire de mener un essai complet; et si les données obtenues pour calculer les constantes cinétiques et le FBC sont fiables (voir paragraphe 93), on peut renoncer à l'essai complet à condition que le FBC obtenu soit loin des valeurs réglementaires critiques.

Dans certains cas, il peut être avantageux de pratiquer l'essai réduit avec plus d'une concentration d'essai, comme un essai préliminaire, pour déterminer si les estimations du FBC pour une substance chimique sont dépendantes de la concentration. Si les estimations du FBC tirées de l'essai réduit sont dépendantes de la concentration, un essai complet s'imposera. Si en revanche, à l'issue d'un essai réduit, les estimations du FBC sont indépendantes de la concentration mais que les résultats sont jugés définitifs, tout essai complet ultérieur pourra être réalisé avec une seule concentration, ce qui réduira le nombre d'animaux utilisés par rapport à un essai complet avec deux concentrations (ou plus).

Les produits chimiques pouvant se prêter à l'essai réduit:

- sont susceptibles de présenter des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre approximatives, obtenues par exemple par rapprochement avec des substances similaires;
- présentent un $\log K_{oe} < 6$, à moins qu'un métabolisme rapide ne soit attendu ⁽¹⁾;
- sont suffisamment hydrosolubles pour la technique d'analyse utilisée (voir paragraphe 24);
- sont clairement quantifiables (les concentrations doivent être environ dix fois plus grandes que le seuil de quantification), dans les poissons et dans l'eau, un marquage radioactif étant recommandé (voir paragraphe 23); et
- il convient soit de prévoir une période d'élimination plus longue que la demi-vie prédite de la substance chimique (voir appendice 5 pour les calculs), soit d'ajuster la durée d'élimination en conséquence (voir paragraphe 91). Une exception à cette règle est autorisée si un métabolisme rapide de la substance est attendu.

PROGRAMME DE PRÉLÈVEMENT POUR LES ESSAIS RÉALISÉS SUIVANT L'ESSAI RÉDUIT

Prélèvement des poissons

Le prélèvement des poissons est réduit à quatre temps d'échantillonnage:

- Au milieu et à la fin de la phase d'absorption (le dernier prélèvement marque le début de la phase d'élimination), soit par exemple après 14 et 28 jours (33).
- Au milieu de la phase d'élimination et à la fin de l'étude (quand la concentration du produit chimique est < 10 % à la concentration maximale, ou une fois clairement passée au moins une demi-vie du produit chimique), soit par exemple après 7 et 14 jours d'élimination (33). Si une élimination rapide est attendue ou observée, il peut s'avérer nécessaire de raccourcir la période d'élimination afin d'éviter que les concentrations dans le poisson ne tombent sous le seuil de quantification.
- Mesure de la teneur en lipides comme dans l'essai complet.
- Correction de la croissance comme dans l'essai complet.
- Le FBC est calculé comme un FBC cinétique.

Prélèvement de l'eau

Lors de l'essai réduit, l'eau est prélevée comme dans l'essai complet (voir paragraphe 54) ou au moins cinq fois à intervalles réguliers pendant la phase d'absorption et une fois par semaine pendant la phase d'élimination.

⁽¹⁾ L'essai réduit peut en effet servir à démontrer un métabolisme rapide attendu comme tel.

Modifications du concept

En fonction des propriétés de la substance d'essai, de la validité des prédictions des RSAQ et de l'objet spécifique de l'étude, il peut être envisageable de modifier le concept de l'essai:

- Si une précision accrue est nécessaire, il est possible d'utiliser plus de poissons (6 ou 8 au lieu de 4) lors du prélèvement réalisé à la fin de la phase d'absorption.
- On inclura un groupe supplémentaire de poissons si après 14 jours (ou à l'issue de la durée prévue de la phase d'élimination) l'élimination n'est pas suffisante (> 50 %). Si la durée prévue de la phase d'élimination est inférieure ou supérieure à 14 jours, il convient d'adapter le programme de prélèvement (un groupe de poissons à l'issue prévue de la phase d'élimination, et un groupe à la moitié de cette phase).
- On utilisera deux concentrations d'essai pour étudier une possible dépendance de la concentration. Si les résultats de l'essai réduit, mené avec deux concentrations d'exposition, montrent que le FBC est indépendant de la concentration (différence inférieure à 20 %), on pourra estimer qu'une concentration d'exposition suffira en cas d'éventuel essai complet.
- Les modèles de processus de bioaccumulation tels que ceux proposés par Arnot *et al.* (35) peuvent probablement aider à prévoir la durée des phases d'absorption et d'élimination (voir aussi l'appendice 5).

Calculs

Les raisons de cette approche tiennent du fait que le facteur de bioconcentration dans un essai complet peut être déterminé comme un facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) en calculant le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les tissus du poisson à la concentration de la substance d'essai dans l'eau, ou en calculant le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption k_1 à la constante cinétique d'élimination k_2 . Le FBC_k est valide même si une concentration à l'état stationnaire d'une substance chimique n'est pas atteinte durant l'absorption, à condition qu'absorption et élimination soient régies pour l'essentiel par des processus cinétiques de premier ordre. Au minimum, deux points sont nécessaires pour estimer les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, l'un à la fin de la phase d'absorption (soit au début de la phase d'élimination) et l'autre à la fin de la phase d'élimination (ou une fois la phase d'élimination bien avancée). Le temps d'échantillonnage intermédiaire est recommandé pour contrôler les cinétiques d'absorption et d'élimination ⁽¹⁾. (Pour les calculs, voir appendices 5 et 6.)

Interprétation des résultats

Pour évaluer la validité et la valeur informative de l'essai, il convient de vérifier que la période d'élimination est supérieure à une demi-vie. De même, on compare le FBC_{km} (FBC cinétique obtenu à partir d'un essai réduit) à la valeur du FBC_{ES} minimisé (qui correspond au FBC_{ES} calculé à la fin de la phase d'absorption, en supposant que l'état stationnaire a été atteint, ce qu'on ne peut que supposer, puisque le nombre de temps d'échantillonnage ne suffit pas à le prouver). Si $FBC_{km} < FBC_{ES}$ minimisé, le FBC_{ES} minimisé sera la valeur à privilégier. Si le FBC_{km} est inférieur à 70 % du FBC_{ES} minimisé, les résultats ne sont pas valides, et un essai complet s'impose.

Si l'essai réduit donne un FBC_{km} avoisinant une valeur réglementaire critique, il faudra mener un essai complet. Si le résultat est loin de toute valeur réglementaire critique (nettement au-dessus ou en-dessous), un essai complet n'est pas forcément nécessaire, ou l'on pourra réaliser un essai complet avec une seule concentration si le cadre réglementaire l'exige.

S'il apparaît à l'issue d'un essai réduit impliquant une seule concentration qu'un essai complet est nécessaire, ce dernier pourra être mené avec une seconde concentration. Si les résultats correspondent, on pourra se passer d'un essai complet avec une concentration différente, puisque la bioconcentration de la substance n'est apparemment pas dépendante de la concentration. Si l'essai réduit a été mené avec deux concentrations et que les résultats ne montrent aucune dépendance de la concentration, on pourra réaliser l'essai complet avec une seule concentration (voir paragraphe 87).

⁽¹⁾ Si seulement deux points sont mesurés, on pourra estimer le seuil de confiance du FBC_{km} selon les méthodes «bootstrap». Lorsque des points intermédiaires sont également disponibles, le seuil de confiance du FBC_{km} peut être calculé comme dans l'essai complet.

Rapport d'essai

Le rapport de l'essai réduit inclut toutes les informations exigées pour l'essai complet (voir paragraphe 81), à l'exception de celles qu'il n'est pas possible d'obtenir (à savoir la courbe montrant la durée avant l'établissement de l'état stationnaire et le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire; à la place de ce dernier, il faudra indiquer le FBC_{ES} minimisé). Il conviendra aussi de préciser les raisons pour lesquelles il a été décidé de mener un essai réduit, et d'indiquer le FBC_{km} obtenu.

C.13 — III: Essai de bioaccumulation chez le poisson avec exposition via la voie alimentaire

INTRODUCTION

La méthode décrite dans cette section s'applique pour les substances ne se prêtant pas à un essai par exposition via le milieu aquatique (par exemple parce qu'il n'est pas possible de maintenir des concentrations stables et mesurables dans l'eau ou d'obtenir des charges corporelles adéquates en 60 jours d'exposition; voir les sections précédentes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique). Il convient néanmoins de noter que cet essai donnera au final un facteur de bioamplification alimentaire (FBA) et non un facteur de bioconcentration (FBC) ⁽¹⁾.

En mai 2001, une nouvelle méthode pour les essais de bioaccumulation de substances organiques peu solubles dans l'eau a été présentée lors de la conférence de SETAC Europe, organisée à Madrid (36). Ce travail s'appuie sur différentes études de bioaccumulation rapportées dans la littérature, utilisant une méthode de dosage avec une alimentation enrichie [voir par exemple (37)]. Début 2004, un projet de protocole (38), destiné à mesurer le potentiel de bioaccumulation des substances organiques peu hydrosolubles pour lesquelles la méthode de bioconcentration par exposition via le milieu aquatique ne convenait pas, a été soumis, avec un document de référence (39), au groupe de travail PBT de l'UE. Parmi les justifications avancées pour appliquer cette méthode, il a été indiqué que l'exposition potentielle de l'environnement à ces substances peu solubles ($\log K_{oc} > 5$) est sans doute largement liée à la voie alimentaire [voir (40) (41) (42) (43) (44)]. Aussi les essais avec exposition par voie alimentaire sont-ils mentionnés dans certains règlements relatifs aux produits chimiques ⁽²⁾. Il convient toutefois de noter que la méthode décrite ici évite soigneusement toute exposition via le milieu aquatique. En conséquence, un FBA obtenu à partir de cette méthode d'essai n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition via le milieu aquatique et par voie alimentaire).

Cette section de la présente méthode d'essai s'appuie sur ce protocole (38) et présente une nouvelle méthode qui ne figurait pas dans la version précédente de la méthode d'essai C.13. Avec cet essai de substitution, il est possible d'étudier directement l'exposition par voie alimentaire dans des conditions de laboratoire bien définies.

Avant de procéder à cette étude, il est indispensable de se reporter aux paragraphes 1 à 14 de la présente méthode d'essai afin de comprendre les circonstances dans lesquelles l'essai avec exposition par voie alimentaire est préféré à l'essai par exposition via le milieu aquatique. Ces paragraphes apportent aussi des informations sur les substances, et il convient d'en prendre connaissance avant de réaliser un essai.

Le marquage radioactif des substances d'essai peut être envisagé pour les mêmes raisons qu'avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique (voir paragraphes 6 et 65).

La méthode d'exposition par voie alimentaire peut servir à analyser plusieurs substances lors d'un seul essai, à condition que certains critères soient remplis; ces critères sont détaillés au paragraphe 112. Par souci de simplicité, la méthode décrit ici un essai pratiqué avec une seule substance d'essai.

L'essai avec exposition par voie alimentaire est similaire à l'essai par exposition via le milieu aquatique à de nombreux égards, à l'exception manifeste du mode d'exposition. Aussi la méthode présentée ici recoupe-t-elle en de nombreux points la méthode d'exposition en milieu aquatique décrite à la section précédente. Dans la mesure du possible, il est fait référence aux paragraphes de la section précédente concernés, mais pour des raisons de lisibilité et de compréhension certaines répétitions n'ont pu être évitées.

⁽¹⁾ Voir définitions et unités à l'appendice 1.

⁽²⁾ Aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) (JO L 396 du 30.12.2006, p 1), cet aspect est abordé dans le «Guide des exigences d'information et d'évaluation de la sécurité chimique» qui lui est associé, chapitre R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1, et figure R7.10-2.

PRINCIPE DE L'ESSAI

On peut appliquer des conditions d'essai dynamiques ou semi-statiques (voir paragraphe 4); il est recommandé de préférer les essais dynamiques pour limiter l'exposition potentielle à la substance d'essai via le milieu aquatique suite à une désorption de l'alimentation enrichie ou des excréments. L'essai comprend deux phases: l'absorption (substance d'essai-aliments enrichis) et l'élimination (aliments «propres», non traités) (voir paragraphe 16). Durant la phase d'absorption, on donne, tous les jours, à un groupe de poissons des aliments du commerce spécifiquement pour poisson et dont la composition est connue, enrichis de la substance d'essai. Idéalement, les poissons consomment toute la nourriture proposée (voir paragraphe 141). Durant la phase d'élimination, on leur donne cette même nourriture du commerce, mais pure, non traitée. Avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique, il est possible, si nécessaire, d'utiliser plus d'un groupe en variant la concentration de la substance d'essai, mais pour la majorité des substances organiques très hydrophobes un groupe d'essai suffit (voir paragraphes 49 et 107). Dans des conditions semi-statiques, le poisson est transféré dans un nouveau milieu et/ou une nouvelle chambre d'essai à la fin de la phase d'absorption (au cas où le milieu ou l'appareillage utilisé pendant la phase d'absorption aurait été contaminé par la substance d'essai par lixiviation). Les concentrations de la substance d'essai dans le poisson sont mesurées lors des deux phases de l'essai. En plus du groupe de poissons nourris avec une alimentation enrichie (le groupe d'essai), un groupe de poissons témoin est maintenu dans des conditions identiques et nourri de la même façon, mais son alimentation n'est pas enrichie avec la substance d'essai. Ce groupe témoin permet de quantifier la concentration de la substance d'essai dans les poissons non exposés et sert de point de comparaison lorsque l'on observe chez le ou les groupes d'essai des effets nocifs liés au traitement ⁽¹⁾. Cela permet aussi de comparer les constantes cinétiques de croissance entre les groupes pour contrôler que la nourriture proposée a été consommée dans les mêmes quantités (il convient aussi de tenir compte des qualités organoleptiques potentiellement différentes de l'alimentation pour expliquer la différence entre les constantes cinétiques de croissance; voir paragraphe 138). Il est important que pendant les phases d'absorption et d'élimination, les groupes d'essai et témoin reçoivent une alimentation équivalente.

Une phase d'absorption qui dure entre 7 et 14 jours est généralement suffisante, à en juger par l'expérience des équipes ayant mis au point ces méthodes d'essai (38) (39). Cette durée devrait permettre de minimiser le coût de l'essai tout en garantissant une exposition suffisante pour la plupart des substances. Toutefois, il peut être préférable dans certains cas de prolonger la phase d'absorption (voir paragraphe 127). Durant cette phase d'absorption, la concentration de la substance dans les poissons peut ne pas atteindre l'état stationnaire si bien que le traitement des données et les résultats issus de cette méthode s'appuient en général sur une analyse cinétique des résidus présents dans les tissus. (Note: on peut appliquer ici les équations servant à estimer la durée nécessaire à l'établissement de l'état stationnaire comme lors de l'essai par exposition en milieu aquatique — voir appendice 5). La phase d'élimination commence au moment où l'on nourrit les poissons avec une alimentation non enrichie; elle dure habituellement jusqu'à 28 jours ou, si cela prend moins de temps, jusqu'à ce que la substance d'essai ne soit plus quantifiable dans le poisson (entier). La phase d'élimination peut être raccourcie ou prolongée au-delà de 28 jours, selon les variations dans le temps des concentrations mesurées et de la taille des poissons.

Cette méthode permet de déterminer la demi-vie spécifique à la substance ($t_{1/2}$, d'après la constante cinétique d'élimination, k_2), le rendement d'assimilation (absorption par voie intestinale; α), le facteur de bioamplification alimentaire cinétique (FBA_k), le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la croissance (FBA_{kg}) et le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la teneur en lipides ⁽²⁾ (FBA_{kl}) (et/ou le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la croissance et des lipides, FBA_{kgl}) pour la substance d'essai dans le poisson. S'agissant de la méthode d'exposition en milieu aquatique, la prise de poids des poissons durant l'essai provoquera chez eux une dilution de la substance d'essai. Le FBA (cinétique) sera donc sous-estimé s'il n'est pas corrigé en conséquence (voir paragraphes 162 et 163). En outre, si on estime que l'état stationnaire a été atteint en phase d'absorption il est possible de calculer un FBA à l'état stationnaire indicatif. Plusieurs méthodes permettent d'estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire [par exemple (44) (45) (46) (47) (48)]. Les pour et les contre de ces approches sont analysés à l'appendice 8.

L'essai a été conçu en premier lieu pour les substances organiques non polaires peu hydrosolubles qui sont régies chez les poissons, pour l'essentiel, par des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre. Quand la substance testée n'est pas régie par des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre, il convient d'employer des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'appendice 5) et de demander conseil à un biostatisticien et/ou pharmacocinéticien.

⁽¹⁾ Pour la plupart des substances d'essai, on ne devrait idéalement rien détecter dans l'eau témoin. Les concentrations naturelles s'expliquent uniquement par la présence logique de matériaux (certains métaux par exemple) et substances omniprésentes dans le milieu.

⁽²⁾ Le FBA étant défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans un organisme et la concentration de la substance dans l'alimentation de cet organisme à l'état stationnaire, les lipides sont pris en compte dans la mesure où l'on corrige les valeurs obtenues en fonction des lipides présents dans l'organisme et dans l'alimentation, d'où le terme plus précis de «correction». Cette approche diffère de la «normalisation» par rapport à une teneur en lipides donnée dans l'organisme comme cela est fait pour l'essai de bioconcentration par exposition en milieu aquatique.

Normalement, on détermine le FBA en utilisant l'analyse de la substance d'essai pour tout le poisson (poids frais). Si cela est pertinent au regard des objectifs de l'étude, il est possible de prélever des tissus déterminés (par exemple les muscles, le foie) si le poisson est divisé en fractions comestibles et non comestibles (voir paragraphe 21). Par ailleurs, le prélèvement et l'analyse distincte du tractus gastro-intestinal peuvent aider à déterminer la contribution aux concentrations dans l'ensemble du poisson à différents temps d'échantillonnage, à la fin de la phase d'absorption et vers le début de la phase d'élimination, ou dans le cadre d'une approche fondée sur le bilan massique.

La teneur en lipides des poissons (entiers) prélevés est mesurée pour que les concentrations puissent être corrigées en fonction de la teneur en lipides dans l'alimentation et dans le poisson (voir paragraphes 56 et 57, et appendice 7).

Chaque poisson prélevé est pesé, et ce poids est consigné (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et relié à la concentration chimique analysée par individu, afin de calculer le développement du poisson en cours d'essai. Dans la mesure du possible, il convient aussi de mesurer la longueur totale du poisson ⁽¹⁾. Les données sur le poids sont aussi nécessaires pour estimer le FBC à partir des données relatives à la phase d'élimination durant l'essai avec exposition par voie alimentaire.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il convient de disposer des informations sur la substance d'essai décrites aux paragraphes 3 et 22. Une méthode permettant d'analyser les concentrations de la substance d'essai dans l'eau n'est habituellement pas nécessaire; il convient que les méthodes à appliquer présentent une sensibilité appropriée pour mesurer les concentrations dans l'alimentation et dans les tissus du poisson.

La méthode utilisée peut servir à tester plus d'une substance lors d'un même essai. Cependant, il convient que les substances d'essai soient compatibles entre elles: elles ne doivent ni interagir ni changer d'identité chimique une fois ajoutées à l'alimentation du poisson. L'objectif est que les résultats mesurés pour chaque substance lors d'essais groupés ne diffèrent pas ou à peine des résultats qui auraient été obtenus avec des essais individuels. Il convient qu'une analyse préliminaire établisse que chaque substance peut être isolée à partir d'un échantillon de poisson ou de nourriture enrichi de plusieurs substances, avec i) des isollements élevés (par exemple > 85 % à la valeur nominale) et ii) la sensibilité nécessaire au bon déroulement de l'essai. Il convient que la dose totale des substances testées simultanément soit inférieure à la concentration combinée susceptible d'entraîner des effets toxiques (voir paragraphe 51). De plus, il convient que le schéma expérimental prenne en compte les éventuels effets nocifs chez le poisson et les interactions possibles (effets métaboliques) associés à l'essai simultané de plusieurs substances. Il convient d'éviter de tester simultanément des substances ionisables. En termes d'exposition, la méthode se prête aussi à des mélanges complexes (voir paragraphe 13, bien que les limites de l'analyse seront les mêmes qu'avec une autre méthode).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai est subordonnée à la réalisation des conditions suivantes (voir paragraphe 24):

- la variation de la température de l'eau est inférieure à ± 2 °C dans les groupes témoins et dans les groupes traités;
- la concentration de l'oxygène dissous reste supérieure ou égale à 60 % de la valeur de saturation de l'air;
- la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation des poissons avant et à la fin de la phase d'absorption est comprise dans un intervalle de ± 20 % (sur la base d'au moins trois prélèvements réalisés à ces deux moments);
- la grande homogénéité de la substance dans l'alimentation est démontrée lors d'une analyse préliminaire de l'alimentation enrichie; au moins trois concentrations de la substance mesurées sur des échantillons prélevés au début de l'essai ne varient pas de ± 15 % de la moyenne;

⁽¹⁾ La longueur totale est aussi être consignée durant l'essai, puisqu'elle constitue un bon indicateur des éventuels effets nocifs observés.

- aucune concentration de la substance d'essai n'est détectée, ou uniquement à l'état de traces habituelles, dans l'alimentation non enrichie ou dans les tissus du poisson témoin;
- la mortalité, les maladies ou d'autres effets nocifs chez les groupes de poissons témoins et testés sont inférieurs ou égaux à 10 % à la fin de l'essai; si l'essai est prolongé pour quelque raison que ce soit, les effets nocifs dans les deux groupes sont inférieurs ou égaux à 5 % par mois, et à 30 % en tout. Des différences significatives de croissance moyenne entre les échantillons du groupe d'essai et du groupe témoin pourraient indiquer un effet toxique de la substance d'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, espèce de poisson différente, changement notable de la taille ou de l'alimentation des poissons, ou de la méthode d'enrichissement, etc.), il est conseillé d'éprouver les compétences techniques disponibles, en utilisant une substance de référence. La substance de référence est principalement utilisée pour établir si la technique d'enrichissement de l'alimentation permet de garantir une homogénéité et une biodisponibilité maximales des substances d'essai. Par exemple, la substance de référence utilisée pour les substances hydrophobes non polaires est l'hexachlorobenzène (HCB), mais en raison des propriétés dangereuses du HCB ⁽¹⁾, il convient de considérer d'autres substances pour lesquelles les données d'absorption et de bioamplification sont fiables. Le cas échéant, les informations générales sur la substance de référence devront figurer dans le rapport d'essai, en particulier le nom, la pureté, le numéro du CAS, la structure, la toxicité (si disponible) comme pour les substances d'essai (voir paragraphes 3 et 22).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

Le matériel et l'appareillage sont utilisés comme décrit pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 26). Il convient d'utiliser un système de renouvellement dynamique ou statique qui fournisse un volume d'eau de dilution suffisant aux récipients d'essai. Il convient aussi de consigner les débits.

Eau

L'eau de l'essai est utilisée comme décrit pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 27 à 29). Il convient que le milieu d'essai présente les caractéristiques requises et que sa qualité reste constante pendant toute la durée de l'essai. La teneur naturelle en particules et en carbone organique total est aussi basse que possible (≤ 5 mg/l pour les matières particulaires; ≤ 2 mg/l pour le carbone organique total) avant le début de l'essai. Le carbone organique total est mesuré uniquement avant l'essai au moment de la caractérisation de l'eau de l'essai (voir paragraphe 53).

Alimentation

Il est recommandé d'utiliser une nourriture pour poisson disponible dans le commerce (granulés flottant et/ou coulant lentement), caractérisée en termes au moins de protéines et riche en matières grasses. Il convient que les granulés présentent une taille uniforme pour accroître l'efficacité de l'exposition par voie alimentaire; de cette façon, les poissons mangeront plus, puisqu'ils ne se contenteront pas de manger les plus gros morceaux, délaissant les plus petits. Il convient aussi que la taille des granulés soit appropriée à la taille des poissons au début de l'essai (diamètre avoisinant 0,6 à 0,85 mm pour les poissons d'une longueur totale comprise entre 3 et 7 cm, et 0,85 à 1,2 mm pour les poissons d'une longueur totale comprise en 6 et 12 cm). On peut ajuster la taille des granulés en fonction du développement des poissons au début de la phase d'élimination. L'appendice 7 donne un exemple d'une nourriture du commerce adaptée. L'alimentation utilisée pour mettre au point cette méthode totalisait en général une teneur en lipides comprise en 15 et 20 % (du poids frais). Il est possible que des aliments pour poisson présentant une teneur en lipides aussi élevée ne soient pas disponibles dans certaines régions. Le cas échéant, l'essai pourrait être réalisé avec une teneur en lipides plus faible et, si nécessaire, d'ajuster la ration alimentaire pour maintenir les poissons en bonne santé (en fonction de l'essai préliminaire). La teneur totale en lipides de l'alimentation du groupe d'essai et du groupe témoin est mesurée et consignée avant le début de l'essai et à la fin de la phase d'absorption. Le rapport d'essai précise les détails fournis par le fabricant des aliments pour poisson dans l'analyse des nutriments, de la teneur en eau, des fibres et de la teneur en cendres, et si possible des minéraux et des résidus de pesticides (polluants prioritaires standard par exemple).

⁽¹⁾ Le HCB figure dans les listes des annexes A et C à la Convention de Stockholm, ainsi que dans les annexes I et III du règlement (CE) n° 850/2004 concernant les polluants organiques persistants (JO L 158 du 30.4.2004, p. 7).

Au moment d'enrichir l'alimentation avec la substance d'essai, il convient de veiller autant que possible à l'homogénéité des aliments utilisés pendant l'essai. La concentration de la substance d'essai dans la nourriture du groupe testé est sélectionnée en fonction de la sensibilité de la technique d'analyse, de la toxicité de la substance d'essai (CSEO si connue) et des données physico-chimiques pertinentes. Le cas échéant, il est préférable d'incorporer la substance de référence suivant une concentration d'environ 10 % de celle de la substance d'essai (ou en tout cas aussi faible que possible), en fonction de la sensibilité de l'analyse (par exemple pour l'hexachlorobenzène, une concentration dans la nourriture de 1 à 100 µg/g est jugée acceptable; voir (47) pour plus d'informations sur les rendements d'assimilation du HCB).

La substance d'essai peut être ajoutée à la nourriture pour poisson de différentes manières, selon ses caractéristiques physiques et sa solubilité (voir annexe 7 pour plus de détails sur les méthodes d'enrichissement):

- si la substance est soluble et stable en triglycérides, la dissoudre dans une petite quantité d'huile de poisson ou d'huile végétale comestible avant de la mélanger à la nourriture pour poisson. Dans ce cas de figure, il convient d'éviter soigneusement de produire une ration trop riche en lipides, en tenant compte de la teneur naturelle en lipides des aliments enrichis et donc en ajoutant la quantité d'huile minimum connue requise pour une répartition homogène de la substance d'essai dans la nourriture, ou;
- enrichir la nourriture avec un solvant organique adapté tant que l'homogénéité et la biodisponibilité ne sont pas compromises [de (micro-)cristaux de la substance d'essai peuvent se former dans les aliments suite à l'évaporation du solvant, sachant qu'il est difficile de prouver que cette évaporation n'a pas eu lieu; voir (49)], ou;
- ajouter des liquides non visqueux directement à la nourriture pour poisson mais en les mélangeant bien pour assurer une répartition homogène et faciliter leur assimilation. Il convient que la technique de mélange garantisse l'homogénéité des aliments enrichis.

Dans certains cas, par exemple avec des substances d'essai moins hydrophobes plus susceptibles de se désorber des aliments, il peut être nécessaire d'enduire les granulés d'une petite quantité d'huile de poisson/germes de maïs (voir paragraphe 142). Il convient alors de traiter la nourriture témoin de même et de mesurer la teneur en lipides de la nourriture finale ainsi préparée.

Le cas échéant, les résultats concernant la substance de référence sont comparables aux données des analyses décrites dans la littérature et menées dans des conditions similaires avec une ration alimentaire comparable (voir paragraphe 45), et les paramètres spécifiques à la substance de référence correspondent aux critères pertinents énoncés au paragraphe 113 (3e, 4e et 5e points).

Si une huile ou un solvant est utilisé comme véhicule pour la substance d'essai, on mélange une quantité équivalente de ce véhicule (en excluant la substance d'essai) à la nourriture témoin de façon à maintenir l'équivalence avec les aliments enrichis. Il est important que pendant les phases d'absorption et d'élimination, les groupes d'essai et témoin reçoivent une alimentation équivalente.

La nourriture enrichie est stockée dans des conditions qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange (par réfrigération par exemple) et ces conditions sont consignées.

Sélection des espèces de poissons

Cet essai peut être réalisé avec les espèces de poissons indiquées pour l'exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 32 et appendice 3). Avant la publication de la présente méthode d'essai, les études de bioaccumulation par la nourriture menées avec des substances organiques utilisaient habituellement la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la carpe (*Cyprinus carpio*) et le tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Il convient que les espèces testées aient un comportement alimentaire tel que la ration administrée est consommée rapidement pour limiter au maximum l'influence potentielle d'un facteur quel qu'il soit sur la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation (par exemple, lixiviation dans l'eau et exposition possible en milieu aquatique). La longueur et le poids des poissons utilisés sont compris dans les limites recommandées (voir appendice 3). Les poissons ne doivent pas être trop petits, ce qui générerait les analyses par individu. Tester des espèces à une période où elles se développent rapidement peut compliquer l'interprétation des données, des taux de croissance élevés pouvant influencer sur le calcul du rendement d'assimilation ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ En cas de développement rapide durant la phase d'absorption, la ration alimentaire réelle descendra en-dessous de celle définie au début de l'exposition.

Conditions de vie des poissons en laboratoire

Les critères relatifs à l'acclimatation, à la mortalité et à d'éventuelles maladies sont les mêmes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 33 à 35).

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Étude préliminaire et essai de détermination de l'ordre de grandeur

Une analyse préliminaire est nécessaire pour démontrer la possibilité d'isoler la substance de la nourriture enrichie ou des tissus du poisson. Il n'est pas toujours nécessaire de réaliser un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour décider de la concentration appropriée de la substance chimique. Afin de montrer qu'aucun effet nocif n'est observé, d'évaluer les qualités organoleptiques de l'alimentation enrichie, de déterminer la sensibilité de la méthode d'analyse des tissus du poisson et des aliments, et de définir la ration alimentaire et les temps d'échantillonnage appropriés durant la phase d'élimination, etc., on peut procéder à des essais d'alimentation préliminaires, mais ce n'est pas obligatoire. Une étude préliminaire peut être utile pour estimer le nombre de poissons nécessaires aux prélèvements durant la phase d'élimination. Elle peut permettre de réduire notablement le nombre de poissons utilisés, surtout pour les substances d'essai très sensibles au métabolisme.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

Une phase d'absorption de 7 à 14 jours est habituellement suffisante; durant cette phase, un groupe de poissons reçoit la nourriture témoin et un autre groupe la nourriture testée. La ration alimentaire qui leur est administrée chaque jour dépend de l'espèce testée et des conditions de l'essai; elle représentera par exemple entre 1 et 2 % du poids du poisson (poids frais) dans le cas de la truite. Cette ration devra être définie de façon à éviter un développement rapide et une augmentation importante de la teneur en lipides. Si besoin, il est possible de prolonger la phase d'absorption en fonction des enseignements tirés d'études antérieures ou des informations connues sur l'absorption ou l'élimination de la substance d'essai (ou analogue) chez le poisson. L'essai proprement dit commence avec la première administration de la nourriture enrichie. Un jour d'essai commence avec l'administration des aliments et se termine peu avant la ration suivante (par exemple une heure avant). Ainsi, en phase d'absorption, le premier jour de l'essai commence avec la première administration de la nourriture enrichie et se termine juste avant la deuxième ration enrichie. En pratique, la phase d'absorption prend fin juste avant (par exemple une heure avant) la première administration de la nourriture non enrichie avec la substance d'essai, sachant que le poisson continue à digérer les aliments enrichis et à absorber la substance d'essai au cours des 24 heures intermédiaires. Il est important de s'assurer que la charge corporelle de la substance d'essai est suffisamment élevée (non-toxique) au regard de la méthode d'analyse appliquée pour pouvoir mesurer une baisse d'au moins une puissance dix durant la phase d'élimination. Dans certains cas, on peut prolonger la phase d'absorption (jusqu'à 28 jours) en réalisant des prélèvements supplémentaires afin d'avoir une idée des cinétiques d'absorption. Pendant l'absorption, la concentration dans le poisson peut ne pas atteindre l'état stationnaire. Pour estimer le temps nécessaire avant atteinte de l'état stationnaire, et avoir ainsi une indication de la durée probable nécessaire avant atteinte de concentrations appréciables dans le poisson, il est possible d'appliquer les équations indiquées pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir appendice 5).

Il arrive que l'on sache à l'avance qu'une durée d'absorption de 7 à 14 jours de la substance chimique dans le poisson ne suffira pas pour que la concentration utilisée dans l'alimentation permette d'atteindre une concentration dans le poisson suffisamment élevée pour analyser une baisse d'au moins une puissance dix durant l'élimination, en raison soit d'une faible sensibilité de la méthode d'analyse soit d'un rendement d'assimilation trop bas. Le cas échéant, il peut être utile d'étendre la phase initiale d'alimentation à plus de 14 jours, ou, surtout s'agissant de substances très métabolisables, d'envisager une concentration dans l'alimentation supérieure. Il convient toutefois de veiller à maintenir la charge corporelle durant l'absorption en-dessous de la concentration sans effet observé (CSEO) chronique (estimée) dans les tissus du poisson (voir paragraphe 138).

Durée de la phase d'élimination

En règle générale, l'élimination dure jusqu'à 28 jours; elle commence dès que l'on donne aux poissons du groupe d'essai une nourriture pure, non traitée, après la phase d'absorption. L'élimination commence avec l'administration de la première ration non enrichie, et non juste après l'administration de la dernière ration enrichie, puisque le poisson continue à digérer les aliments et à absorber la substance d'essai au cours des 24 heures intermédiaires, comme indiqué au paragraphe 126. C'est pourquoi le premier prélèvement de la phase d'élimination est réalisé juste avant la deuxième ration non enrichie. Cette période d'élimination vise à capturer les substances d'une demi-vie potentielle de 14 jours, ce qui correspond aux caractéristiques des substances bioaccumulables⁽¹⁾, un essai d'une durée de 28 jours couvre donc deux demi-vies de ces substances. Avec les substances fortement bioaccumulables, il peut être utile de prolonger la phase d'élimination (si indiqué par l'essai préliminaire).

Si une substance est éliminée très lentement au point qu'on ne peut pas atteindre une demi-vie exacte durant la phase d'élimination, les informations obtenues peuvent néanmoins suffire à indiquer un niveau élevé de bioaccumulation et permettre de réaliser les évaluations. À l'inverse, si une substance est éliminée très rapidement au point qu'on ne peut déduire ni aucune concentration fiable au temps 0 (concentration à la fin de l'absorption ou au début de l'élimination, $C_{0,d}$) ni k_2 , on procédera à une estimation basse de k_2 (voir appendice 7).

Si les premières analyses des poissons prélevés (à 7 ou 14 jours par exemple) montrent que la substance chimique a été éliminée en-dessous des niveaux prévus avant la fin de la période complète de 28 jours, on peut annuler les prélèvements suivants et arrêter l'essai.

Dans certains cas, on ne constate aucune absorption mesurable de la substance d'essai à la fin de la période d'absorption (ou avec le deuxième prélèvement de l'élimination). Si l'on peut démontrer que i) les critères de validité énoncés au paragraphe 113 sont satisfaits, et que ii) cette faible absorption n'est pas due à un défaut de l'essai (par exemple durée d'absorption insuffisante, technique d'enrichissement inadéquate entraînant une faible biodisponibilité, sensibilité insuffisante de la méthode d'analyse, non ingestion des aliments par les poissons, etc.), alors il est possible d'arrêter l'étude sans avoir à renouveler l'essai avec une durée d'absorption plus longue. Si au vu de l'étude préliminaire cela semble être le cas, il peut être conseillé, si possible, d'analyser les excréments pour étudier la substance d'essai non digérée suivant une approche fondée sur le bilan massique.

Nombre de poissons testés

Comme pour l'essai par exposition via le milieu aquatique, il convient de sélectionner des poissons de poids et de longueurs similaires, le plus petit d'entre eux ne devant pas peser moins de deux tiers du poids du poisson le plus gros (voir paragraphes 40 à 42).

Le nombre total de poissons utilisés pour l'étude est établi en fonction du programme de prélèvement (au minimum un prélèvement à la fin de la phase d'absorption et entre quatre et six prélèvements pendant la phase d'élimination, selon la durée de chaque phase). Il convient également de prendre en compte la sensibilité de la technique d'analyse, la concentration susceptible d'être atteinte à l'issue de la phase d'absorption (selon les informations disponibles au préalable) et la durée de l'élimination (si les informations disponibles au préalable permettent de l'estimer). Il convient de prélever chaque fois entre cinq et dix poissons et d'en mesurer le développement (poids et longueur totale) avant l'analyse chimique ou lipidique.

En raison de la variabilité inévitable de la taille, du développement et de la physiologie des poissons et de la quantité probablement variable de nourriture ingérée par chacun, il est nécessaire de prélever à chaque temps d'échantillonnage au moins cinq poissons du groupe d'essai et cinq poissons du groupe témoin pour établir de façon appropriée la concentration moyenne et sa variabilité. La variabilité des paramètres à considérer chez les poissons est susceptible d'accroître plus la variabilité générale non maîtrisée de l'essai que la variabilité inhérente aux méthodes d'analyse appliquées, ce qui justifie l'utilisation dans certains cas de jusqu'à dix poissons par prélèvement. Toutefois, si les concentrations de référence de la substance d'essai dans les poissons témoins ne sont pas mesurables au début de l'élimination, l'analyse chimique de deux à trois poissons témoins au dernier temps d'échantillonnage suffira uniquement si l'on continue à prélever les poissons restants du groupe témoin en fonction de leur poids et de leur longueur totale (de façon à prélever chaque fois le même nombre dans les groupes d'essai et témoin pour tenir compte de leur développement). Les poissons sont stockés, pesés individuellement (même s'il s'avère finalement nécessaire de combiner les résultats des prélèvements) et mesurés (longueur totale).

⁽¹⁾ Dans le cadre d'une étude avec exposition via le milieu aquatique, une demi-vie de 14 jours correspondrait à un FBC d'environ 10 000 l/kg si on utilisait des poissons de 1 g avec une cinétique d'absorption avoisinant 500 l/kg/j [selon l'équation de Sijm et al. (46)].

Ainsi, un essai type prévoyant une phase d'élimination de 28 jours avec cinq prélèvements nécessitera au total entre 59 et 120 poissons dans le groupe d'essai et entre 50 et 110 poissons dans le groupe témoin, en supposant que la technique d'analyse de la substance permette d'analyser la teneur en lipides sur un même poisson. S'il n'est pas possible d'analyser la substance chimique et la teneur en lipides sur le même poisson et que l'utilisation d'un poisson témoin pour analyser la teneur en lipides n'est pas envisageable (voir paragraphe 56), on devra ajouter 15 poissons (trois du stock de poissons au début de l'essai, trois respectivement du groupe témoin et du groupe d'essai au début de l'élimination et trois respectivement du groupe témoin et du groupe d'essai à la fin de l'expérience). On trouvera un exemple de programme de prélèvement avec les nombres des poissons utilisés à l'appendice 4.

Taux de charge

Les ratios eau/poissons sont aussi élevés qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 43 et 44). Bien que les taux de charge poissons/eau n'influent pas sur les concentrations d'exposition dans cet essai, il est recommandé d'appliquer un taux de charge compris entre 0,1 et 1,0 g de poisson (poids frais) par litre d'eau et par jour pour maintenir des concentrations adéquates d'oxygène dissous et minimiser le stress de l'essai sur les organismes.

Nourriture testée et alimentation

Durant la période d'acclimatation, les poissons reçoivent une alimentation appropriée (voir paragraphe 117). Si l'essai est réalisé avec un système de renouvellement dynamique, il convient d'interrompre le renouvellement au moment de nourrir les poissons.

Durant l'essai, il convient que l'alimentation du groupe testé soit conforme aux critères décrits précédemment (voir paragraphes 116 à 121). En plus des caractéristiques de la substance testée, de la sensibilité de la méthode d'analyse, de la concentration attendue dans l'alimentation en fonction des conditions environnementales et des niveaux de toxicité chronique/charge corporelle, il convient de tenir compte, pour définir la concentration cible de la substance, des qualités organoleptiques des aliments (qui ne repoussent pas les poissons). La concentration nominale de la substance d'essai est consignée dans le rapport d'essai. D'expérience, les concentrations comprises entre 1 et 1 000 µg/g fournissent une fourchette d'étude adéquate pour les substances qui ne présentent aucun mécanisme toxique spécifique. S'agissant des produits chimiques dont l'action obéit à un mécanisme non spécifique, les résidus présents dans les tissus n'excèdent pas 5 µmol/g de lipides, sinon ils risquent d'entraîner des effets chroniques (19) (48) (50) ⁽¹⁾. Concernant les autres substances, il convient de s'assurer qu'aucun effet nocif ne résulte de l'exposition cumulée (voir paragraphe 127). Cela est d'autant plus vrai si plusieurs substances sont testées en même temps (voir paragraphe 112).

La quantité adéquate de la substance d'essai peut être ajoutée à la nourriture pour poisson de trois façons (voir paragraphe 119 et appendice 7). Les méthodes et procédures d'enrichissement utilisées sont spécifiées dans le rapport d'essai. Les aliments non traités sont donnés aux poissons témoins; si une huile non enrichie ou un solvant est utilisé comme véhicule dans la nourriture enrichie durant la phase d'absorption, la nourriture non traitée devra contenir une quantité équivalente de cette huile ou être traitée avec ce solvant à l'état pur. Il est nécessaire d'analyser au moins trois échantillons de la concentration de la substance d'essai dans les aliments, traités et non traités, avant le début et à la fin de la phase d'absorption. Après exposition à la nourriture traitée (phase d'absorption), les poissons (des deux groupes) reçoivent de la nourriture non traitée (phase d'élimination).

Les poissons reçoivent une ration déterminée (en fonction de l'espèce; d'environ 1 à 2 % du poids frais par jour dans le cas de la truite). Cette ration alimentaire est déterminée de façon à éviter un développement rapide des poissons et une hausse importante de la teneur en lipides. Il convient de spécifier dans le rapport les rations administrées tout au long de l'essai. La première ration s'appuie sur les poids mesurés dans le stock de poisson juste avant le début de l'essai. La quantité est ajustée en fonction du poids frais des poissons prélevés aux différents temps prévus, pour tenir compte de leur développement en cours d'essai. Les poids et les longueurs des poissons dans les récipients d'essai et témoins peuvent être estimés à partir des poids et des longueurs totales des poissons utilisés à chaque échantillonnage; il ne faut pas peser ou mesurer le poisson restant dans les récipients d'essai et témoins. Il est important de respecter la ration alimentaire fixée tout au long de l'expérience.

⁽¹⁾ Les concentrations internes réelles ne pouvant être déterminées qu'à l'issue de l'essai, il est nécessaire d'estimer la concentration interne attendue (par exemple en s'appuyant sur le FBA attendu et sur la concentration dans la nourriture; voir à l'appendice 5 l'équation A5.8).

Il convient d'observer l'alimentation des poissons pour s'assurer qu'ils consomment visiblement toute la nourriture présentée et donc que les taux d'ingestion utilisés dans les calculs sont justes. On considérera la pertinence de réaliser des essais d'alimentation préliminaires ou de prendre en compte des expériences antérieures pour déterminer une ration alimentaire qui garantisse que toute la nourriture journalière administrée en une fois est consommée. Quand les poissons laissent systématiquement une partie de cette nourriture, il peut être judicieux de répartir la dose en ajoutant une prise par jour d'essai (même quantité journalière mais divisée par deux et administrée en deux fois au lieu d'une, par exemple). Au besoin, la seconde prise interviendra à un moment précis et sera chronométrée de façon à ce que le maximum de temps possible s'écoule avant le prélèvement des poissons (par exemple, cette seconde prise interviendra pendant la première moitié d'une journée d'essai).

Bien que les poissons consomment en général rapidement la nourriture administrée, il est important de s'assurer que la substance chimique reste adsorbée dans les aliments. On évitera donc que la substance d'essai ne se disperse dans l'eau, ce qui exposerait les poissons à des concentrations aqueuses de la substance d'essai en plus de la voie alimentaire. Pour cela, il convient de retirer les aliments non consommés (et les excréments) des récipients d'essai et témoins dans l'heure voire, de préférence, dans les 30 minutes suivant l'administration. De plus, il est possible d'utiliser un système par lequel l'eau est nettoyée en continu au moyen d'un filtre à charbon actif, qui adsorbe tout contaminant dissous. Les systèmes de renouvellement dynamiques peuvent aider à évacuer rapidement les particules alimentaires et les substances dissoutes⁽¹⁾. Parfois, modifier la technique d'enrichissement des aliments peut contribuer à atténuer le problème (voir paragraphe 119).

Lumière et température

Concernant la méthode d'exposition via le milieu aquatique (voir paragraphe 48), une photopériode de 12 à 16 heures est recommandée et la température (± 2 °C) est adaptée à l'espèce testée (voir appendice 3). Il convient de connaître le type et les caractéristiques de l'illumination et de les spécifier dans le rapport.

Témoins

Il convient d'utiliser un groupe témoin auquel on donne la même ration qu'au groupe d'essai mais sans ajouter la substance d'essai à leur nourriture. Si une huile ou un solvant a été utilisé comme véhicule pour enrichir les aliments du groupe d'essai, il faudra traiter la nourriture du groupe témoin exactement de la même façon mais sans ajouter la substance d'essai de façon à ce que l'alimentation des groupes d'essai et témoin soit équivalente (voir paragraphes 121 et 139).

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

Les conditions décrites pour l'essai par exposition en milieu aquatique s'appliquent ici aussi, à l'exception du fait que le carbone organique total est mesuré uniquement avant l'essai au moment de la caractérisation de l'eau de l'essai (voir paragraphe 53).

Prélèvement et analyse des poissons et alimentation

Analyse des échantillons alimentaires

Au moins trois échantillons de la nourriture d'essai et témoin sont analysés pour déterminer la concentration de la substance d'essai et la teneur en lipides, au minimum avant le début et à la fin de la phase d'absorption. Les méthodes d'analyse et les procédures appliquées pour garantir l'homogénéité de l'alimentation sont spécifiées dans le rapport d'essai.

⁽¹⁾ La présence de la substance d'essai dans le milieu de l'essai à travers les excréments du poisson ou par lixiviation de la nourriture ne peut pas être totalement évitée. Aussi est-il possible par exemple de mesurer la concentration de la substance présente dans l'eau à la fin de la phase d'absorption, surtout si on utilise un système semi-statique, afin d'établir si une exposition en milieu aquatique est intervenue.

Il convient d'analyser la substance d'essai dans les échantillons suivant la méthode définie et validée. Une étude préliminaire est réalisée pour établir la limite de quantification, le pourcentage d'isolement, les interférences et la variabilité de l'analyse pour la matrice d'échantillon prévue. Si l'on teste du matériel radiomarqué, on devra considérer les mêmes aspects qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique, l'analyse des aliments remplaçant l'analyse de l'eau (voir paragraphe 65).

Analyse des poissons

À chaque temps de prélèvement, on prélève entre 5 et 10 individus dans chacun des groupes, témoin et d'essai (dans certains cas, le nombre de poissons témoins peut être réduit; voir paragraphe 134).

Les prélèvements ont lieu, chaque jour de l'expérience, au même moment (en fonction du moment auquel les poissons sont nourris) et sont chronométrés pour réduire au maximum la probabilité que des aliments restent dans les intestins durant la phase d'absorption et au début de la phase d'élimination, et éviter ainsi de fausser les concentrations totales de la substance d'essai (il convient donc de prélever les poissons à la fin d'une journée d'essai, sachant qu'un jour d'essai commence avec l'administration des aliments et se termine juste avant la ration suivante, soit approximativement 24 heures plus tard). L'élimination commence avec la première ration de nourriture «non enrichie» (voir paragraphe 128). Le premier prélèvement de la phase d'élimination (réalisé juste avant la deuxième ration non enrichie) est important, puisqu'il sert à extrapoler la concentration au temps 0, un jour plus tôt, ($C_{0,d}$, la concentration dans le poisson à la fin de l'absorption/au début de l'élimination). En option, il est aussi possible de prélever et d'analyser séparément le tractus gastro-intestinal du poisson à la fin de l'absorption et aux jours 1 et 3 de l'élimination.

À chaque temps d'échantillonnage, il convient de prélever les poissons des groupes d'essai et témoin et de les traiter de la même façon qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 61 à 63).

On mesure les concentrations de la substance d'essai dans le poisson (poids frais) au moins à la fin de la phase d'absorption et pendant la phase d'élimination dans les groupes témoin et d'essai. Durant la phase d'élimination, quatre à six temps d'échantillonnage sont recommandés (par exemple aux jours 1, 3, 7, 14 et 28). En option, il est aussi possible d'inclure un temps d'échantillonnage supplémentaire après 1 à 3 jours d'absorption pour estimer le rendement d'assimilation à partir de la phase linéaire de l'absorption, puisqu'encore très proche du début de la période d'exposition. La méthode décrite tolère deux écarts: i) si on prolonge la phase d'absorption pour étudier les cinétiques d'absorption, il faudra prévoir un temps d'échantillonnage supplémentaire durant la phase d'absorption et donc inclure des poissons supplémentaires (voir paragraphe 126); ii) si aucune absorption mesurable n'intervient à la fin de la phase d'absorption, on devra mettre fin à l'essai (voir paragraphe 131). Chaque poisson prélevé est pesé (et sa longueur totale mesurée) pour permettre de déterminer les constantes cinétiques de croissance. On peut aussi mesurer les concentrations de la substance dans des tissus spécifiques du poisson (fractions comestibles et non comestibles) à la fin de l'absorption et à des moments précis de l'élimination. Si l'on teste du matériel radiomarqué, il est nécessaire de considérer les mêmes aspects qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique, l'analyse des aliments remplaçant l'analyse de l'eau (voir paragraphe 65).

En cas d'utilisation périodique d'une substance de référence (voir paragraphe 25), il est préférable de mesurer les concentrations dans le groupe d'essai à la fin de l'absorption et à tous les temps de l'élimination spécifiés pour la substance d'essai (poisson entier); il convient d'analyser uniquement les concentrations dans le groupe témoin à la fin de l'absorption (poisson entier). Parfois (par exemple quand les techniques d'analyse de la substance d'essai et de la substance de référence sont incompatibles au point qu'il est nécessaire d'utiliser des poissons supplémentaires pour respecter le programme de prélèvement), on pourra appliquer une autre approche pour minimiser le nombre de poissons supplémentaires nécessaires. Les concentrations de la substance de référence sont mesurées pendant l'élimination uniquement aux jours 1, 3 et lors de deux autres temps d'échantillonnage, sélectionnés de manière à obtenir des estimations fiables de la concentration au temps 0 ($C_{0,d}$) et de k_2 pour cette substance de référence.

Si possible, la teneur en lipides de chaque poisson est déterminée à chaque prélèvement, ou au moins au début et à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination (voir paragraphes 56 et 67). Selon la méthode d'analyse retenue (voir paragraphe 67 et appendice 4), il est possible d'utiliser les mêmes poissons pour déterminer la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai. Cela permet de minimiser le nombre de poissons nécessaires. Néanmoins, quand ce n'est pas possible, il convient d'appliquer l'approche décrite pour la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 56 les différentes options envisageables pour mesurer la teneur en lipides). La méthode appliquée pour quantifier la teneur en lipides est spécifiée dans le rapport.

Qualité de la méthode d'analyse

Il est nécessaire de mener des essais préliminaires pour s'assurer de la spécificité, de la précision et de la reproductibilité de la technique d'analyse spécifique à la substance, ainsi que de l'isolement de la substance d'essai à partir de l'alimentation et du poisson.

Mesure du développement des poissons

Au début de l'essai, il convient de peser et de mesurer un échantillon de poissons du stock. Ces poissons sont prélevés juste avant la première administration de l'alimentation enrichie (une heure avant par exemple) et assignés au jour d'essai 0. Il convient que le nombre de poissons prélevés soit égal ou supérieur à celui des poissons prélevés ultérieurement pendant l'essai. Il peut s'agir des mêmes poissons utilisés pour l'analyse lipidique réalisée avant le début de la phase d'absorption (voir paragraphe 153). À chaque temps d'échantillonnage, les poissons sont d'abord pesés puis mesurés. Pour chaque poisson, le poids (et la longueur) est relié à la concentration chimique analysée (et s'il y a lieu à la teneur en lipides), par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé. Ces mesures peuvent servir à estimer le poids (et la longueur) des poissons restant dans les récipients d'essai et témoins.

Évaluation de l'essai

Il convient de consigner chaque jour les observations relatives à la mortalité. On observera et enregistrera aussi tout effet nocif, par exemple un comportement anormal ou une pigmentation. Les poissons sont considérés morts en l'absence de mouvement respiratoire ou de réaction à un léger stimulus mécanique. Tout poisson mort ou visiblement moribond devra être retiré.

RAPPORT D'ESSAI ET RÉSULTATS

Traitement des résultats

Les résultats des essais sont utilisés pour calculer la constante cinétique d'élimination (k_e) en fonction du poids frais total du poisson. La constante cinétique de croissance, k_g , basée sur la progression moyenne du poids du poisson est calculée et utilisée pour produire la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance, k_{2g} , s'il y a lieu. Il convient en outre de consigner le rendement d'assimilation (a ; absorption par voie intestinale), le facteur de bioamplification cinétique (FBA_k) (si nécessaire corrigé de la croissance, FBA_{k_g}), sa valeur corrigée des lipides ($FBA_{k_{L}}$ ou $FBA_{k_{g,L}}$, si corrigé de l'effet de dilution par la croissance) et la ration alimentaire. Par ailleurs, s'il est possible d'estimer le temps nécessaire à l'instauration de l'état stationnaire durant la phase d'absorption (par exemple 95 % de l'état stationnaire ou $t_{95} = 3,0/k_e$), on pourra inclure une estimation du FBA à l'état stationnaire (FBA_{ES}) (voir paragraphes 105 et 106 et appendice 5) si la valeur t_{95} indique que l'état stationnaire semble atteint. Il convient d'appliquer la même correction lipidique au FBA_{ES} qu'au FBA cinétique (FBA_k) pour obtenir une valeur corrigée de la teneur en lipides, FBA_{ESL} (il n'existe aucune procédure convenue pour corriger un FBA à l'état stationnaire de l'effet de la dilution par la croissance). Les formules et des exemples de calcul sont présentés à l'appendice 7. Plusieurs méthodes permettent d'estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire. Elles sont discutées à l'appendice 8.

Poids et longueur des poissons

Le poids frais et la longueur de chaque poisson, à chaque temps d'échantillonnage, sont présentés séparément pour les groupes d'essai et les groupes témoins pendant la phase d'absorption [poissons du stock au début de la période d'absorption; groupe témoin et groupe d'essai à la fin de la période d'absorption et, le cas échéant, au début de la période (par exemple jours 1 à 3 de l'absorption) et pendant la phase d'élimination (par exemple jours 1, 2, 4, 7, 14, 28, pour le groupe d'essai et le groupe témoin)]. Le poids est la mesure du développement à privilégier afin de corriger les valeurs de l'effet de dilution par la croissance. Les paragraphes 162 et 163 et l'appendice 5 présentent la ou les méthode(s) utilisée(s) pour cette correction.

Concentration de la substance d'essai dans les poissons

Les mesures des résidus de la substance d'essai réalisées sur chaque poisson (ou sur des échantillons regroupés si des mesures individuelles ne sont pas possibles), exprimées en concentration du poids frais, sont présentées séparément selon les temps d'échantillonnage pour les groupes d'essai et témoins. Si une analyse lipidique a été réalisée sur chacun des poissons prélevés, on calculera et consignera les concentrations individuelles corrigées de la teneur en lipides, exprimées en teneur en lipides du poids frais.

- Les mesures des résidus de la substance d'essai réalisées sur chaque poisson (ou sur des échantillons regroupés si des mesures individuelles ne sont pas possibles, voir paragraphe 66) pour la période d'élimination sont converties dans leurs logarithmes naturels et portées sur un graphique en fonction du temps (jour). Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur le tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.
- Une corrélation des moindres carrés linéaires est calculée pour $\ln(\text{concentration})$ en fonction du temps (jour) d'élimination. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont consignées comme la constante cinétique d'élimination globale (k_2) et le logarithme naturel de la concentration au temps 0 ($C_{0,d}$) obtenue (voir annexe 5 et appendice 7 pour plus de détails). Si cela n'est pas possible parce que les concentrations tombent sous la limite de quantification pour le deuxième prélèvement de l'élimination, on peut procéder à une estimation basse de k_2 (voir appendice 7).
- Les écarts de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite sont calculés en utilisant les procédés statistiques standard, et les intervalles de confiance de 90 % (ou 95 %) autour de ces résultats sont évalués et présentés.
- La concentration moyenne mesurée dans le poisson au dernier jour de l'absorption (concentration mesurée au temps 0, $C_{0,m}$) est aussi calculée et comparée à la valeur déduite $C_{0,d}$. Quand la valeur déduite est inférieure à la valeur mesurée, l'écart entre les deux peut indiquer la présence, dans les intestins, d'aliments enrichis non digérés. Si la valeur déduite est nettement supérieure à la valeur mesurée, cela peut signifier que la valeur déduite de la régression linéaire des données d'élimination est erronée et devrait être réévaluée (voir appendice 7).

Vitesse d'élimination et facteur de bioamplification

Pour calculer le facteur de bioamplification, il convient tout d'abord d'obtenir le rendement d'assimilation (absorption de la substance d'essai par voie intestinale, α). Pour cela, il convient d'appliquer l'équation A7.1 à l'appendice 7, qui nécessite de connaître la concentration dans le poisson obtenue au temps 0 de la phase d'élimination ($C_{0,d}$), la constante cinétique d'élimination (globale) (k_2), la concentration dans les aliments (C_{alim}), la constante cinétique d'ingestion (I) et la durée de la phase d'absorption (t). La pente et l'ordonnée à l'origine de la relation linéaire entre $\ln(\text{concentration})$ et le temps d'élimination sont consignées comme la constante cinétique d'élimination globale ($k_2 = \text{pente}$) et la concentration au temps 0 ($C_{0,d} = e^{\text{ordonnée}}$), comme indiqué précédemment. Il convient de contrôler la plausibilité biologique des valeurs obtenues (par exemple, le rendement d'assimilation sous forme de fraction n'est pas supérieur à 1). (I) est calculée en divisant la masse des aliments par la masse du poisson nourri chaque jour (s'il est nourri à 2 % de son poids, I sera égal à 0.02). Néanmoins, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la ration alimentaire utilisée dans les calculs en fonction du développement des poissons (en utilisant la constante cinétique de croissance connue pour estimer le poids du poisson à chaque temps de prélèvement durant la phase d'absorption; voir appendice 7). Dans les cas où il n'est pas possible d'obtenir k_2 et $C_{0,d}$ parce que, par exemple, les concentrations ont chuté sous le seuil de détection au moment du deuxième prélèvement d'élimination, on peut procéder à une estimation basse de k_2 et borner FBAk supérieurement (voir appendice 7).

Une fois le rendement d'assimilation (α) obtenu, on peut calculer le facteur de bioamplification en multipliant α par la constante cinétique d'ingestion (I) et en la divisant par la constante cinétique d'élimination (globale) (k_2). Le facteur de bioamplification corrigé de l'effet de dilution par la croissance est calculé de la même façon mais en utilisant la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g} ; voir paragraphes 162 et 163). Il est aussi possible d'estimer le rendement d'assimilation si on a analysé les tissus des poissons prélevés lors de la phase initiale linéaire de l'absorption (voir paragraphe 151 et appendice 7). Cette valeur représente une estimation indépendante du rendement d'assimilation pour un organisme quasiment non exposé (à savoir le poisson prélevé au tout début de la phase d'absorption). Le rendement d'assimilation estimé à partir des données de l'élimination sert habituellement à obtenir le FBA.

Correction de la teneur en lipides et correction de la dilution par la croissance

La croissance des poissons pendant la phase d'élimination peut réduire les concentrations chimiques mesurées chez eux, ce qui augmente la constante cinétique d'élimination globale, k_2 , par rapport à ce que provoqueraient les processus d'élimination seuls (par exemple métabolisme, égestion) (voir paragraphe 72). La teneur en lipides des poissons d'essai (fortement associée à la bioaccumulation des substances hydrophobes) et la teneur en lipides des aliments peuvent suffisamment varier dans la pratique pour que leur correction soit nécessaire pour obtenir des facteurs de bioamplification qui aient un sens. Le facteur de bioamplification est corrigé de l'effet de dilution par la croissance (comme le FBC cinétique avec la méthode d'exposition en milieu aquatique) et corrigé de la teneur en lipides des aliments en fonction de celle du poisson (le facteur de correction en fonction des lipides). Les appendices 5 et 7 présentent les équations respectives et donnent des exemples de calculs de ce type.

Pour corriger de la dilution par la croissance, il convient de calculer la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}) (voir appendice 5 pour les équations). Cette constante cinétique d'élimination corrigée (k_{2g}) est utilisée pour calculer le facteur de bioamplification corrigé de la croissance, comme indiqué au paragraphe 73. Dans certains cas, cette méthode n'est pas possible. Une autre méthode contournant la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance consiste à utiliser le poids de la substance d'essai par poisson (entier) lors de l'élimination plutôt que le poids de la substance d'essai par unité de masse du poisson (concentration). Ce calcul est facile à faire, car dans le cadre d'essais respectant la présente méthode d'essai, on associe les concentrations tissulaires aux poids individuels des poissons. L'appendice 5 présente la procédure de calcul simple. Il convient de souligner que le recours à cette méthode alternative n'empêche pas qu'il faille estimer et consigner la valeur de k_2 .

Pour corriger la teneur en lipides des aliments et du poisson quand l'analyse lipidique n'a pas été réalisée sur tous les poissons prélevés, on déduit les fractions lipidiques moyennes (du poids frais) dans le poisson et dans les aliments⁽¹⁾. Le facteur de correction de la teneur en lipides (L_c) est alors calculé en divisant la fraction lipidique moyenne du poisson par la fraction lipidique moyenne des aliments. Le facteur de bioamplification, corrigé de la croissance ou pas, est divisé par le facteur de correction de la teneur en lipides pour calculer le facteur de bioamplification corrigé des lipides.

Si l'analyse chimique et l'analyse lipidique ont été menées sur le même poisson au même temps d'échantillonnage, il convient d'utiliser ces données corrigées des lipides par poisson pour calculer directement un FBA corrigé des lipides [voir (37)]. La courbe de la concentration corrigée en fonction des lipides donne CO_d et k_2 . On peut ensuite procéder à une analyse mathématique en utilisant les équations à l'appendice 7, mais le rendement d'assimilation (a) est calculé en utilisant la constante cinétique d'ingestion normalisée par rapport aux lipides ($I_{lipides}$) et la concentration dans l'alimentation en fonction des lipides ($C_{alim-lipides}$). Les paramètres corrigés de la teneur en lipides sont alors utilisés de façon similaire pour calculer le FBA (pour calculer le FBA_{kgL} corrigé de la teneur en lipides et de la croissance, on applique aussi la correction de la constante cinétique de croissance à la fraction lipidique et non au poids frais du poisson).

Interprétation des résultats

La croissance moyenne dans le groupe d'essai et celle dans le groupe témoin en principe ne diffèrent pas beaucoup afin d'exclure les effets toxiques. Les constantes cinétiques de croissance ou les courbes de croissance des deux groupes sont comparées au moyen d'une procédure adaptée⁽²⁾.

Rapport d'essai

Une fois l'étude terminée, il convient de rédiger un rapport final présentant les informations sur la substance d'essai, l'espèce testée et les conditions expérimentales énumérées au paragraphe 81 (pour la méthode d'exposition en milieu aquatique). En outre, ce rapport devra aussi inclure les renseignements suivants:

- (1) Cette méthode est spécifique à l'étude fondée sur l'alimentation, et varie de la procédure appliquée pour l'exposition en milieu aquatique; aussi employons-nous le terme «correction» au lieu de «normalisation» afin d'éviter toute confusion — voir aussi la note de bas de page du paragraphe 106.
- (2) On peut réaliser un test t sur les constantes cinétiques de croissance, pour tester si le développement entre les groupes témoins et d'essai varie, ou test F en cas d'analyse des écarts. Si besoin, on peut recourir à un test F ou à un essai fondé sur les rapports de probabilité pour faciliter le choix du modèle de croissance approprié [monographie OCDE n° 54 (32)].

Substance d'essai:

- Toute information sur la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture préparée;

Conditions expérimentales:

- La concentration nominale de la substance dans les aliments, la technique d'enrichissement utilisée, la quantité de véhicule (lipides) utilisé pour cet enrichissement (le cas échéant), les concentrations mesurées de la substance d'essai dans l'alimentation enrichie pour chaque analyse (d'au moins trois échantillons, avant le début de l'étude et à la fin de la phase d'absorption) et les valeurs moyennes.
- Le cas échéant, le type et la qualité de l'huile ou du solvant (classe, fabricant, etc.) utilisé pour l'enrichissement.
- Le type de nourriture utilisée (analyse immédiate ⁽¹⁾, classe ou qualité, fabricant, etc.), la ration alimentaire durant la phase d'absorption, la quantité de nourriture administrée et la fréquence (en incluant les ajustements réalisés en fonction du poids des poissons prélevés).
- Le moment auquel les poissons ont été prélevés et euthanasiés pour l'analyse chimique à chaque temps d'échantillonnage (par exemple une heure avant l'administration de la ration du jour suivant).

Résultats:

- Résultats des études préliminaires.
- Informations sur les effets nocifs observés.
- Description complète de tous les procédés d'analyse chimique utilisés, y compris les seuils de détection et de quantification, la variabilité et l'isolement.
- Concentrations lipidiques mesurées dans la nourriture (témoin et enrichie), valeurs individuelles, moyennes et écarts-types.
- Tableau des poids (et longueurs) de chaque poisson des groupes témoin et d'essai (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et calculs, constante(s) cinétique(s) de croissance obtenues et intervalle(s) de confiance de 95 %.
- Tableau des concentrations de la substance d'essai dans les poissons, concentrations moyennes mesurées à la fin de l'absorption ($C_{0,m}$), et constante cinétique d'élimination (globale) obtenue (k_2) et concentration dans le poisson au début de la phase d'élimination ($C_{0,d}$) ainsi que les écarts de ces valeurs (pente et ordonnée à l'origine).
- Tableau des teneurs en lipides par poisson (s'il y a lieu, liste des concentrations de substances spécifiques), valeur moyennes pour les groupes témoin et d'essai au début de l'essai, à la fin de l'absorption et à la fin de l'élimination.
- Courbes (incluant toutes les données mesurées), montrant (s'il y a lieu, les concentrations peuvent être exprimées pour l'animal entier ou des tissus spécifiques):
 - le développement (soit le poids (et la longueur) du poisson en fonction du temps) ou le poids transformé en logarithme naturel en fonction du temps;
 - l'élimination de la substance d'essai dans le poisson; et
 - la concentration transformée en logarithme naturel (\ln concentration) en fonction du temps d'élimination (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_2 , et la concentration dans le poisson déduite du logarithme naturel au début de la phase d'élimination, $C_{0,d}$).
- Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur un tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.

⁽¹⁾ Technique d'analyse des aliments s'attachant à la teneur en protéines, en lipides, en cellulose brute et en cendres. Ces informations sont habituellement disponibles auprès du fabricant.

- Constante cinétique d'élimination et demi-vie calculées corrigées de la croissance.
- Rendement d'assimilation calculé (?).
- FBA alimentaire "brut", FBA cinétique corrigé des lipides et de la croissance ("brut" et corrigé des lipides selon le poids frais total du poisson), FBA spécifique à certains tissus s'il y a lieu.
- Toute information concernant les métabolites de la substance d'essai radiomarquée et leur accumulation.
- Toute anomalie concernant l'essai, tout écart à ces modes opératoires et toute autre information pertinente.
- Un tableau synthétisant les données mesurées et calculées pertinentes, comme ci-après:

| Constantes cinétiques d'élimination de la substance et facteurs de bioamplification (FBAk) | |
|---|---|
| k_g (constante cinétique de croissance; jour-1): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| k_2 (constante cinétique d'élimination globale, jour-1): | Insérer la valeur (IC de 95 %) |
| k_{2g} (constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance; jour-1): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| $C_{0,m}$ (concentration mesurée au temps 0, concentration dans le poisson à la fin de l'absorption) ($\mu\text{g/g}$): | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| $C_{0,d}$ (concentration obtenue au temps 0 de la phase d'élimination; $\mu\text{g/g}$): | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| I (taux d'ingestion fixé; g de nourriture/g de poisson/jour): | Insérer la valeur |
| I_g (ration alimentaire effective, ajustée de la croissance; g de nourriture/g poisson/jour) ⁽²⁾ | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| C_{alim} (concentration de la substance chimique dans les aliments; $\mu\text{g/g}$): | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| α (rendement d'assimilation de la substance): | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| FBA_k (FBA alimentaire cinétique): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| FBA_{kg} (FBA alimentaire cinétique corrigé de la croissance): | Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾ |
| $t_{1/2g}$ (demi-vie corrigée de la croissance, en jours): | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| L_c (facteur de correction de la teneur en lipides): | Insérer la valeur |
| FBA_{kgl} (FBA cinétique corrigé de la croissance et des lipides): | Insérer la valeur |
| $\text{FBA}_{\text{ES-L}}$ (FBA à l'état stationnaire indicatif corrigé des lipides) ⁽²⁾ | Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾ |

⁽¹⁾ IC: intervalle de confiance (quand estimation possible)

⁽²⁾ ET: écart-type (quand estimation possible)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Chapitre C.13 de la présente annexe, Bioconcentration: Essai dynamique chez le poisson.
- (2) Chapitre A.6 de la présente annexe, Solubilité dans l'eau.
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035.
- (4) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partage (n-octanol/eau): méthode par agitation en flacon.
- (5) Chapitre A.24 de la présente annexe, Coefficient de partage (n-octanol/eau), méthode HPLC.
- (6) Chapitre A.23 de la présente annexe, Coefficient de partage (1-octanol/eau): méthode du brassage lent.
- (7) Chapitre C.7 de la présente annexe, Hydrolyse en fonction du pH.
- (8) OCDE (1997). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, Numéro 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
- (9) Chapitre A.5 de la présente annexe, Tension superficielle des solutions aqueuses.
- (10) Chapitre A.4 de la présente annexe, Pression de vapeur.
- (11) Chapitre C.4 de la présente annexe, Biodégradabilité facile
- (12) Chapitre C.29 de la présente annexe, Biodégradabilité facile — dégagement de CO₂ dans des flacons hermétiquement clos.
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. Février 2011. Disponible à l'adresse: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. et Schäfers C. (2012). Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of LD OCDE 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13, publié le 3 avril 2012.

- (22) Chapitre C.47 de la présente annexe: Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie.
- (23) Chapitre C.15 de la présente annexe: Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin.
- (24) Chapitre C.14 de la présente annexe: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles.
- (25) OCDE (2000). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, Numéro 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, États-Unis.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, États-Unis.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, États-Unis.
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OCDE (2006). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, Numéro 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, États-Unis.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonyme (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonyme (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.

- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
- (51) OCDE (2012), OECD Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, N° 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le rendement d'assimilation (α) est une mesure de la quantité relative de substance absorbée dans l'organisme par les intestins (α n'a pas d'unité, mais est exprimé plus souvent en pourcentage qu'en fraction).

La bioaccumulation renvoie généralement à un processus selon lequel la concentration de la substance chimique dans un organisme atteint un niveau qui excède celle mesurée dans le milieu environnant (par exemple, l'eau pour un poisson ou l'air pour un mammifère), dans la nourriture, ou les deux (1).

La bioconcentration est l'accroissement de la concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme (ou dans un tissu spécifié de ce dernier) par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioconcentration (FBC ou KB) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de cet essai d'accumulation est la concentration de la substance d'essai dans ou sur le poisson ou dans un tissu spécifié de ce dernier (C_p en mg/kg) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_e en mg/l). Le FBC est exprimé en $l \cdot kg^{-1}$. Il convient de noter que les corrections de la croissance et/ou d'une teneur en lipides type ne sont pas prises en compte.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme (ou des tissus spécifiques de cet organisme) relative à la concentration de la substance d'essai dans les aliments.

Le facteur de bioamplification (FBA) est la concentration d'une substance chez un prédateur relative à la concentration chez la proie (ou l'alimentation) de ce prédateur à l'état stationnaire. La méthode d'essai décrite ici évite soigneusement toute exposition par le milieu aquatique. En conséquence, un FBA obtenu à partir de cette méthode d'essai n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition en milieu aquatique et par voie alimentaire).

Le facteur de bioamplification alimentaire (FBA alimentaire) est le terme utilisé dans cette méthode d'essai pour décrire le résultat de l'essai avec exposition par voie alimentaire, dans lequel on évite soigneusement toute exposition par le milieu aquatique; le FBA alimentaire obtenu avec cette méthode n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition en milieu aquatique et par voie alimentaire).

La phase d'élimination ou de post-exposition (perte) est la période qui fait suite au transfert des poissons testés d'un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance, période pendant laquelle on étudie l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les poissons testés (ou par un tissu spécifié de ces derniers).

La constante cinétique d'élimination (de perte) (k_2) est la valeur numérique qui représente la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans les poissons testés (ou dans un tissu spécifié de ces derniers) à la suite du transfert des poissons testés d'un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance (k_2 est exprimée en $jour^{-1}$).

Le carbone organique dissous (COD) est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques dissoutes dans les milieux d'essai.

La phase d'exposition ou d'absorption correspond au temps pendant lequel les poissons sont exposés à la substance d'essai.

Le taux d'ingestion des aliments (I) correspond à la quantité moyenne de nourriture consommée par chaque poisson chaque jour, relative au poids total moyen estimé du poisson (exprimé en g de nourriture/g de poisson/jour).

Le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) est le rapport entre la constante cinétique d'absorption, k_1 , et la constante cinétique d'élimination, k_2 (soit k_1/k_2 — voir dans cette appendice les définitions correspondantes). En principe, la valeur doit être comparable au FBC_{ES} (voir la définition ci-dessus), mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain ou si des corrections de la croissance ont été appliquées au FBC cinétique.

Le facteur de bioconcentration cinétique normalisé des lipides (FBC_{kl}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %.

Le facteur de bioconcentration cinétique normalisé des lipides, corrigé de la croissance (FBC_{kgl}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % et corrigé de la croissance en cours d'essai comme décrit à l'appendice 5.

Le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire normalisé des lipides (FBC_{est}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %.

Aux fins du règlement REACH, on entend par substance multiconstituants une substance dont plus d'un constituant principal est présent en concentration comprise entre 10 % et 80 % (poids/poids).

Le coefficient de partage n-octanol/eau (K_{oe}) est le ratio de la solubilité d'un produit chimique dans le n octanol et dans l'eau à l'équilibre [méthodes d'essai A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; il est aussi représenté par P_{oe} . Le logarithme de K_{oe} est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

Le carbone organique particulaire (COP) est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques en suspension dans les milieux d'essai.

La microextraction en phase solide (MEPS) est une technique d'analyse réalisée sans solvant et développée pour les systèmes dilués. Avec cette méthode, une fibre polymère est exposée à la phase gazeuse ou liquide contenant la substance à analyser. En général, un temps d'analyse minimum est imposé de manière à ce que les conditions d'équilibre soient établies entre les phases solide et fluide, en fonction des espèces testées. Par la suite, la concentration de la substance à analyser peut être déterminée directement à partir de la fibre ou après l'avoir extraite de la fibre dans un solvant, en fonction de la technique de détermination utilisée.

Un état stationnaire est atteint sur la courbe représentant la concentration de la substance d'essai dans un poisson (C_p) par rapport au temps quand cette courbe devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_p , réalisées sur des échantillons prélevés à au moins deux jours d'intervalle, ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'on ne constate aucune augmentation notable de la C_p dans le temps entre la première et la dernière analyse successive. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins quatre analyses successives. Pour les substances d'essai qui sont absorbées lentement, il serait plus approprié de prendre des intervalles de sept jours.

La valeur du facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{est}) ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant étant constante pendant cette période (voir la définition de l'état stationnaire).

Le carbone organique total (TOC) est une mesure de la concentration de carbone provenant de toutes les sources organiques dans les milieux d'essai, y compris les sources particulières et dissoutes.

La constante cinétique d'absorption (k_1) est la valeur numérique qui représente la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans ou sur les poissons testés (ou dans un tissu spécifié de ces derniers) lorsque les poissons sont exposés à cette substance (k_1 est exprimé en $L\ kg^{-1}\ jour^{-1}$).

Les substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques sont identifiés par l'abréviation UVCB

Un produit chimique est une substance ou un mélange.

Un produit chimique d'essai est une substance ou un mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

-
- (2) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partage (n-octanol/eau): méthode par agitation en flacon
 - (3) Chapitre A.24 de la présente annexe, Coefficient de partage (n-octanolng/eau), méthode HPLC.
 - (4) Chapitre A.23 de la présente annexe, Coefficient de partage (1-octanol/eau): méthode du brassage lent.
-

Appendice 2

QUELQUES CARACTERISTIQUE CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ADMISSIBLE

| Substance | Concentration maximale |
|---|------------------------|
| Matières particulaires | 5 mg/l |
| Carbone organique total | 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | 1 µg/l |
| Chlore résiduel | 10 µg/l |
| Pesticides organophosphorés totaux | 50 ng/l |
| Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés | 50 ng/l |
| Chlore organique total | 25 ng/l |
| Aluminium | 1 µg/l |
| Arsenic | 1 µg/l |
| Chrome | 1 µg/l |
| Cobalt | 1 µg/l |
| Cuivre | 1 µg/l |
| Fer | 1 µg/l |
| Plomb | 1 µg/l |
| Nickel | 1 µg/l |
| Zinc | 1 µg/l |
| Cadmium | 100 ng/l |
| Mercure | 100 ng/l |
| Argent | 100 ng/l |

Appendice 3

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI

| Espèces recommandées | Gamme de températures recommandée durant l'essai (°C) | Longueur totale recommandée de l'animal testé (cm) ⁽²⁾ |
|---|---|---|
| <i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré | 20 — 25 | 3,0 ± 0,5 |
| <i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête-de-boule | 20 — 25 | 5,0 ± 2,0 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpe commune | 20 — 25 | 8,0 ± 4,0 ⁽³⁾ |
| <i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Modaka | 20 — 25 | 4,0 ± 1,0 |
| <i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy | 20 — 25 | 3,0 ± 1,0 |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Crapet arlequin | 20 — 25 | 5,0 ± 2,0 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Truite arc-en-ciel | 13 — 17 | 8,0 ± 4,0 |
| <i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Épinoche de rivière | 18 — 20 | 3,0 ± 1,0 |

⁽¹⁾ Meyer *et al.* (1)

⁽²⁾ Il est préférable durant l'essai proprement dit de privilégier le poids pour mesurer les écarts des constantes cinétiques de croissance. Néanmoins il est reconnu que la longueur est une mesure plus pratique si le poisson doit être sélectionné à vue au début d'une expérience (au sein du stock de poissons).

⁽³⁾ Cette fourchette de longueurs est indiquée dans la loi japonaise sur les substances chimiques: Testing Methods for New Chemical Substances etc., based on the Japan's Chemical Substances Control Law (CSCL).

Plusieurs espèces estuariennes et marines ont été utilisées plus rarement, notamment:

| | |
|------------------------|-----------------------------------|
| Tambour croca | (<i>Leiostomus xanthurus</i>) |
| Fondule tête de mouton | (<i>Cyprinodon variegatus</i>) |
| Prêtre capucette | (<i>Menidia beryllina</i>) |
| Perche méné | (<i>Cymatogaster aggregata</i>) |
| Carlottin anglais | (<i>Parophrys vetulus</i>) |
| Chabot | (<i>Leptocottus armatus</i>) |
| Épinoche de rivière | (<i>Gasterosteus aculeatus</i>) |
| Bar | (<i>Dicentracus labrax</i>) |
| Ablette | (<i>Alburnus alburnus</i>) |

Les poissons d'eau douce mentionnés dans le tableau qui précède sont faciles à élever et/ou à se procurer tout au long de l'année, tandis que la disponibilité des espèces marines ou estuariennes est en partie limitée à leurs pays d'origine. Afin d'être en bonne santé et d'ascendance connue, les animaux à tester peuvent être élevés et se reproduire dans des fermes aquacoles ou en laboratoire, où ils sont protégés des maladies et des parasites. Ces poissons se trouvent dans beaucoup de parties du monde.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.
-

Appendice 4

PROGRAMMES DE PRÉLÈVEMENT POUR LES ESSAIS D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE ET PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. Exemple théorique d'un programme de prélèvement pour un essai de bioconcentration avec exposition exclusivement en milieu aquatique pratiqué sur une substance dont le $\log K_{oe} = 4$.

| Prélèvement de poissons | Programme de prélèvement | | Nombre d'échantillons d'eau ⁽¹⁾ | Nombre de poissons par échantillon ⁽¹⁾ |
|-------------------------|---|---|--|--|
| | Fréquence minimale requise (jours) ⁽²⁾ | Prélèvement supplémentaire (jours) ⁽²⁾ | | |
| Phase d'absorption | | | | |
| 1 | - 1 | | 2 ⁽³⁾ | 4 ⁽⁴⁾ |
| | 0 | | (2) | (3 ⁽⁶⁾) |
| 2 | 0,3 | | 2 | 4 |
| | | 0,4 | (2) | (4) |
| 3 | 0,6 | | 2 | 4 |
| | | 0,9 | (2) | (4) |
| 4 | 1,2 | | 2 | 4 |
| | | 1,7 | (2) | (4) |
| 5 | 2,4 | | 2 | 4 |
| | | 3,3 | (2) | (4) |
| 6 | 4,7 | | 2 | 4 — 8 ⁽⁵⁾ |
| | | | | (3 ⁽⁵⁾) |
| Phase d'élimination | | | | Transférer les poissons dans une eau dépourvue de la substance d'essai |
| 7 | 5,0 | | 2 | 4 |
| | | 5,3 | | (4) |
| 8 | 5,9 | | 2 | 4 |
| | | 7,0 | | (4) |
| 9 | 9,3 | | 2 | 4 |
| | | 11,2 | | (4) |

| Prélèvement de poissons | Programme de prélèvement | | Nombre d'échantillons d'eau ⁽¹⁾ | Nombre de poissons par échantillon ⁽¹⁾ |
|-------------------------|---|---|--|---|
| | Fréquence minimale requise (jours) ⁽²⁾ | Prélèvement supplémentaire (jours) ⁽²⁾ | | |
| Phase d'absorption | | | | |
| 10 | 14,0 | | 2 | 4 — 8 ⁽⁵⁾ |
| | | 17,5 | | (4 + 3 ⁽⁶⁾) |
| TOTAL | | | | 40 — 72 (48 — 80) ⁽⁵⁾ |

- (¹) Les valeurs entre parenthèses correspondent au nombre d'échantillons (eau, poissons) à prélever lors d'un éventuel prélèvement supplémentaire.
- (²) L'estimation avant l'essai du k_2 d'une substance dont le $\log K_{oc} = 4$ s'élève à $0,652 \text{ jours}^{-1}$. La durée totale de l'expérience est fixée à $3 \times t_{ES}$, soit $3 \times 4,6 \text{ jours} = 14 \text{ jours}$. L'estimation de t_{ES} est présentée à l'appendice 5.
- (³) Prélever un échantillon d'eau après que l'équivalent du volume d'au moins trois enceintes ait été versé.
- (⁴) Ces poissons sont prélevés dans le stock de poisson.
- (⁵) Si une précision accrue ou des études de métabolisme sont requises, nécessitant plus de poissons, ces poissons devront être prélevés en particulier à la fin des phases d'absorption et de dépuraction (voir paragraphe 40).
- (⁶) Au moins trois poissons supplémentaires pourront être nécessaires pour analyser la teneur en lipides s'il n'est pas possible d'utiliser les poissons prélevés pour mesurer les concentrations de la substance au début de l'essai, à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. Il convient de noter qu'il devrait être possible dans de nombreux cas d'utiliser seulement les trois poissons témoins (voir paragraphe 56).

2. Exemple théorique d'un programme de prélèvement pour un essai de bioaccumulation de la substance par voie alimentaire avec des phases d'absorption et d'élimination de respectivement 10 et 42 jours.

| Prélèvement de poissons | Programme de prélèvement | | Nombre d'échantillons de nourriture | Nombre de poissons par échantillon | |
|-------------------------|--------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| | Jour de la phase | Prélèvements supplémentaires? | | Groupe d'essai | Groupe témoin |
| Phase d'absorption | | | | | |
| 1 | 0 | Possible ⁽¹⁾ ⁽²⁾ | 3 — groupe d'essai | 0 | 5 — 10 |
| | | | 3 — groupe témoin ⁽¹⁾ | | (8 — 13) ⁽²⁾ |
| 1A ⁽³⁾ | 1-3 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 2 | 10 | Oui ⁽⁴⁾ | 3 — groupe d'essai | 10 — 15 ⁽⁴⁾ | 5 — 10 |
| | | | 3 — groupe témoin ⁽¹⁾ | (13 — 18) ⁽⁵⁾ | (8 — 13) ⁽⁵⁾ |
| Phase d'élimination | | | | | |
| 3 | 1 | Oui ⁽⁴⁾ | | 10 — 15 ⁽⁴⁾ | 5 — 10 |
| 4 | 2 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 5 | 4 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |

| Prélèvement de poissons | Programme de prélèvement | | Nombre d'échantillons de nourriture | Nombre de poissons par échantillon | |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| | Jour de la phase | Prélèvements supplémentaires? | | Groupe d'essai | Groupe témoin |
| Phase d'absorption | | | | | |
| 6 | 7 | Oui ⁽⁴⁾ | | 10 — 15 ⁽⁴⁾ | 5 — 10 |
| 7 | 14 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 8 | 28 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 9 | 42 | Oui ⁽⁴⁾ | | 10 — 15 ⁽⁴⁾ (13 — 18) ⁽⁵⁾ | 5 — 10 (8 — 13) ⁽⁵⁾ |
| TOTAL | | | | 59 — 120 (63 — 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾ | 50 — 110 (56 — 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾ |

- (1) Trois échantillons de nourriture des groupes témoin et d'essai sont analysés pour mesurer les concentrations de la substance d'essai et la teneur en lipides.
- (2) Les poissons sont prélevés du stock le plus tard possible avant le début de l'étude; au moins trois poissons du stock sont prélevés au début de l'essai pour mesurer la teneur en lipides.
- (3) Le prélèvement (facultatif) au début de la phase d'absorption fournit les données nécessaires pour calculer l'assimilation de la substance d'essai ingérée par voie alimentaire, que l'on peut comparer au rendement d'assimilation calculé à partir des données obtenues lors de la phase d'élimination.
- (4) On peut prélever cinq poissons supplémentaires pour l'analyse de tissus spécifiques.
- (5) Au moins trois poissons supplémentaires pourront être nécessaires pour analyser la teneur en lipides s'il n'est pas possible d'utiliser les poissons prélevés pour mesurer les concentrations de la substance au début de l'essai, à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. Il convient de noter qu'il devrait être possible dans de nombreux cas d'utiliser seulement les trois poissons témoins (voir paragraphes 56 et 153).

Note concernant la durée des phases et les temps d'échantillonnage: la phase d'absorption commence avec l'administration de la première ration enrichie. Le premier jour de l'essai commence avec la première administration de nourriture et se termine juste avant la suivante, 24 heures plus tard. Le premier prélèvement (1 dans le tableau) devrait intervenir juste avant la première administration de nourriture (une heure avant par exemple). Idéalement, il faudrait chaque fois prélever les poissons juste avant la ration du jour suivant (soit environ 23 heures après la dernière ration). La phase d'absorption prend fin juste avant la première administration de la nourriture non enrichie, quand la phase d'élimination commence (il est probable que les poissons du groupe d'essai digèrent encore les aliments enrichis dans les 24 heures suivant la dernière administration de nourriture enrichie). Autrement dit, le dernier prélèvement de la phase d'absorption intervient juste avant la première ration non enrichie, et le premier prélèvement de la phase d'élimination intervient environ 23 heures après la première ration non enrichie.

Appendice 5

CALCULS GÉNÉRAUX

1. Introduction
2. Prédiction de la durée de la phase d'absorption
3. Prédiction de la durée de la phase d'élimination
4. Méthode séquentielle: détermination de la constante cinétique d'élimination (de perte) k_2
5. Méthode séquentielle: détermination de la constante cinétique d'absorption k_1 (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)
6. Méthode simultanée de calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination (perte) (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)
7. Correction de l'effet de dilution par la croissance pour le FBC cinétique et le FBA
8. Normalisation des lipides à 5 % de la teneur en lipides (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

1. INTRODUCTION

Le modèle général de bioaccumulation en milieu aquatique chez le poisson peut être décrit en termes de processus d'absorption et de perte, en ignorant l'absorption par voie alimentaire. L'équation différentielle (dC_p/dt) qui décrit la vitesse de modification de la concentration dans le poisson ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$) est donnée avec (1):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 \times C_e - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \quad [\text{Équation A5.1}]$$

Où

k_1 = Constante cinétique du premier ordre pour l'absorption de la substance chez le poisson ($\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$).

k_2 = Constante cinétique du premier ordre pour l'élimination de la substance chez le poisson (jour^{-1}).

k_g = Constante cinétique du premier ordre pour la croissance du poisson (effet de dilution par la croissance) (jour^{-1})

k_m = Constante cinétique du premier ordre pour la transformation métabolique (jour^{-1})

k_e = Constante cinétique du premier ordre pour l'égestion des excréments (jour^{-1})

C_e = Concentration dans l'eau ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

C_p = Concentration dans le poisson ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids frais).

S'agissant de substances bioaccumulables, on peut s'attendre à ce qu'une moyenne pondérée par rapport au temps soit la concentration d'exposition dans l'eau (C_e) la plus pertinente au sein de la fourchette de fluctuations autorisée (voir paragraphe 24). Il est recommandé de calculer une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau en suivant les instructions données à l'appendice 6 de la méthode d'essai C.20 (2). Notons que le ln-transformation de la concentration dans l'eau est approprié quand on s'attend à un déclin exponentiel entre les périodes de renouvellement, par exemple dans des conditions d'essai semi-statiques. Avec un système dynamique, le ln-transformation des concentrations d'exposition n'est pas forcément nécessaire. Si on obtient une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau, il convient de la consigner et de l'utiliser dans les calculs suivants.

Dans un essai FBC type réalisé chez des poissons, l'absorption et l'élimination peuvent être décrites en termes de deux processus cinétiques de premier ordre.

$$\text{Cinétique d'absorption} = k_1 \times C_e \quad [\text{Équation A5.2}]$$

$$\text{Cinétique d'élimination globale} = (k_2 + k_g + k_m + k_d) \times C_p \quad [\text{Équation A5.3}]$$

À l'état stationnaire, en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables (les valeurs pour k_g et k_m ne peuvent pas être distinguées de zéro), la cinétique d'absorption est égale à la cinétique d'élimination, et donc en combinant les équations A5.2 et A5.3 on obtient la relation suivante:

$$\text{BCF} = \frac{C_{p-ES}}{C_{e-ES}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Équation A5.4}]$$

Où

C_{p-ES} = Concentration dans le poisson à l'état stationnaire (mg kg^{-1} du poids frais).

C_{e-ES} = Concentration dans l'eau à l'état stationnaire (mg l^{-1}).

Le ratio de k_1/k_2 correspond au FBC cinétique (FBC_k) et devrait être égal au FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) obtenu à partir du rapport entre la concentration à l'état stationnaire dans le poisson et la concentration à l'état stationnaire dans l'eau, mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain ou si des corrections de la croissance ont été appliquées au FBC cinétique. Néanmoins, k_1 et k_2 étant des constantes, il n'est pas nécessaire que l'état stationnaire soit atteint pour obtenir un FBC_k .

Fondée sur ces équations du premier ordre, cette annexe 5 présente les calculs généraux nécessaires pour les deux méthodes de bioaccumulation, avec exposition en milieu aquatique et exposition par voie alimentaire. Les sections 5, 6 et 8 sont uniquement pertinentes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique, mais ont été incluses ici parce qu'elles relèvent de techniques «générales». Les méthodes en mode séquentiel (sections 4 et 5) et simultané (section 6) permettent de calculer les constantes d'absorption et d'élimination qui servent à obtenir les FBC cinétiques. Utilisée pour déterminer k_2 (section 4), la méthode séquentielle est importante pour l'exposition par voie alimentaire, puisqu'elle aide à calculer à la fois le rendement d'assimilation et le FBA. L'annexe 7 détaille les calculs spécifiques à la méthode d'exposition par voie alimentaire.

2. PREDICTION DE LA DUREE DE LA PHASE D'ABSORPTION

Avant de commencer l'essai, on peut estimer k_2 et, par conséquent, un certain pourcentage du temps requis pour atteindre l'état stationnaire, à partir des relations empiriques entre k_2 et le coefficient de partage n-octanol/eau (K_{ow}) ou k_1 et le FBC. Il convient toutefois de tenir compte du fait que les équations présentées dans cette section s'appliquent uniquement quand l'absorption et l'élimination sont régies par une cinétique du premier ordre. Si cela n'est manifestement pas le cas, il est conseillé de demander l'avis d'un biostatisticien et/ou d'un pharmacocinéticien, pour savoir si des prédictions de la durée de la phase d'absorption sont souhaitables.

Plusieurs méthodes permettent d'estimer k_2 (jour^{-1}). Par exemple, on pourra utiliser en premier lieu les relations empiriques suivantes ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (r^2 = 0,95) [(3); \text{Équation A5.5}]$$

ou

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{FBC}} \quad [\text{Équation A5.6}]$$

$$\text{Où } k_1 = 520 \times P^{-0,32} \quad (\text{pour les substances de } \log K_{ow} > 3) \quad (r^2 = 0,85) [(4); \text{Équation A5.7}]$$

$$\text{Et } \text{FBC} = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) [(5); \text{Équation A5.8}]$$

⁽¹⁾ Comme pour toute relation empirique, il convient de vérifier que la substance d'essai tombe dans le domaine d'applicabilité de la relation

P = poids moyen du poisson traité (en grammes de poids frais) à la fin de l'absorption/au début de l'élimination ⁽¹⁾

Pour d'autres relations associées, voir (6). Il peut être avantageux d'employer des modèles plus complexes pour estimer k_2 si, par exemple, il est probable qu'un métabolisme notable intervienne (7) (8). Néanmoins, en raison de la complexité accrue du modèle, on veillera à accorder une attention particulière à l'interprétation des prédictions. Ainsi, la présence de groupes nitro pourrait indiquer un métabolisme rapide, mais ce n'est pas toujours le cas. Aussi l'utilisateur doit-il considérer les résultats de la méthode prédictive au regard de la structure chimique et de toute autre information pertinente (notamment des résultats des études préliminaires) pour programmer une étude.

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stationnaire peut être déduit, en appliquant l'estimation de k_2 , de l'équation cinétique générale qui décrit l'absorption et l'élimination (cinétique du premier ordre), en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables. En cas de développement substantiel durant l'étude, les estimations décrites ci-dessous ne seront pas fiables. Il est alors préférable d'utiliser la k_{2g} corrigée de la croissance (voir la section 7 de la présente annexe):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 C_e - k_2 C_p \quad \text{[Équation A5.9]}$$

ou, si C_e est constante:

$$C_p = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_e (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[Équation A5.10]}$$

Lorsqu'on se rapproche de l'état stationnaire ($t \rightarrow \infty$), l'équation A5.10 peut être réduite (voir. (9) (10)) à:

$$C_p = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_e \quad \text{[Équation A5.11]}$$

ou

$$\frac{C_p}{C_e} = \frac{K_1}{K_2} = FBC \quad \text{[Équation A5.12]}$$

$FBC \times C_e$ est donc une approximation de la concentration dans le poisson à l'état stationnaire (C_p ES). [Note: la même approche peut être utilisée pour estimer un FBA à l'état stationnaire lors d'un essai avec exposition par voie alimentaire. Dans ce cas, le FBC est remplacé par le FBA, et la C_e par la C_{alim} , la concentration dans les aliments, dans les équations ci-dessus.]

L'équation A5.10 peut être reformulée de la façon suivante:

$$C_p = C_{p-ES} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[Équation A5.13]}$$

or

$$\frac{C_p}{C_{p-ES}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[Équation A5.14]}$$

En appliquant l'équation A5.14, le temps nécessaire à l'obtention d'un certain pourcentage de l'état stationnaire peut être prédit lorsque k_2 est estimée à l'avance à l'aide de l'équation A5.5 ou A5.6.

À titre d'orientation, la durée statistiquement optimale de la phase d'absorption, pour la production de données statistiquement acceptables (FBC_k), est la période requise pour que la courbe du logarithme de la concentration de la substance d'essai dans le poisson en fonction du temps atteigne au moins 50 % de l'état stationnaire (soit $0,69/k_2$), mais pas plus de 95 % de l'état stationnaire (soit $3,0/k_2$) (11). Si l'accumulation dépasse 95 % de l'état stationnaire, le calcul d'un FBC_{ES} devient faisable.

⁽¹⁾ Le poids des poissons à la fin de la phase d'absorption peut être estimé en fonction des données d'une étude précédente ou des connaissances accumulées sur l'espèce d'essai, dont on sait qu'elle est susceptible de se développer à partir d'un poids au départ de l'essai habituel et sur une durée d'absorption habituelle (par exemple 28 jours).

Le temps nécessaire pour atteindre 80 % de l'état stationnaire est égal à (en utilisant l'équation A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Équation A5.15}]$$

ou

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Équation A5.16}]$$

De même, le temps pour atteindre 95 % de l'état stationnaire est donné par:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Équation A5.17}]$$

À titre d'exemple, la durée de la phase d'absorption (soit le temps nécessaire à l'obtention d'un certain pourcentage de l'état stationnaire, par exemple t_{80} ou t_{95}) d'une substance d'essai dont le $\log K_{oe} = 4$ atteindrait (en appliquant les équations A5.5, A5.16 et A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ jour}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ jours (59 heures)}$$

$$\text{ou } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ jours (110 heures)}$$

Sinon, la formule suivante:

$$t_{eES} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{oe} + 55,31 \text{ (heures)} \quad [\text{Équation A5.18}]$$

peut être utilisée pour calculer le temps nécessaire pour que l'état stationnaire réel (t_{eES}) soit atteint (12). Pour une substance d'essai dont le $\log K_{oe} = 4$ cela donne:

$$t_{eES} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ heures}$$

3. PREDICTION DE LA DUREE DE LA PHASE D'ELIMINATION

Une prédiction du temps requis pour ramener la charge corporelle à un certain pourcentage de la concentration initiale peut aussi être obtenue à partir de l'équation générale qui décrit l'absorption et l'élimination (en supposant une cinétique du premier ordre, voir l'équation A5.9 (1) (13).

En ce qui concerne la phase d'élimination, C_e (ou C_{alim} pour l'essai avec exposition par voie alimentaire) est supposée être nulle. L'équation peut donc être réduite à:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_2 C_p \quad [\text{Équation A5.19}]$$

ou

$$C_p = C_{p,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Équation A5.20}]$$

où $C_{p,0}$ est la concentration au début de la période d'élimination.

t_{50} correspond au moment où l'élimination aura atteint 50 %:

$$\frac{C_p}{C_{p,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ou

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

De même, l'élimination s'élèvera à 95 % à t_{95} :

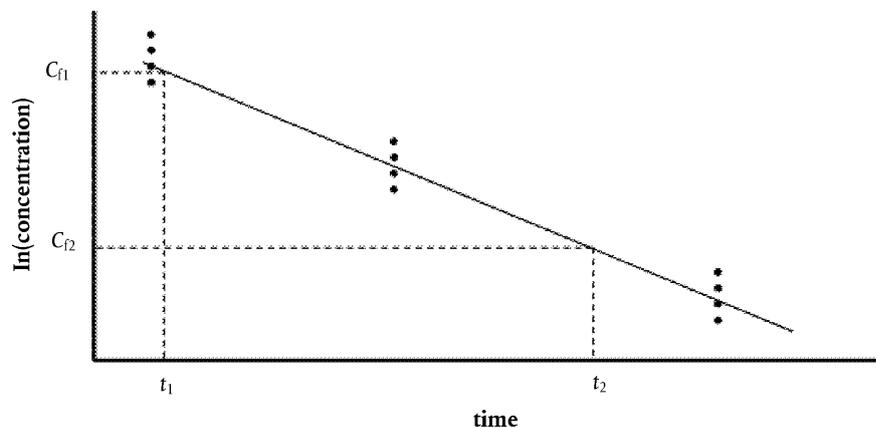
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Si on adopte 80 % d'absorption pour la première phase ($1,6/k_2$) et une perte de 95 % pour la phase d'élimination ($3,0/k_2$), alors la phase d'élimination vaut approximativement le double de la phase d'absorption.

Il convient de noter que les estimations reposent sur l'hypothèse suivant laquelle les processus d'absorption et d'élimination sont régis par une cinétique du premier ordre. Si ces processus n'obéissent manifestement pas à une cinétique du premier ordre, ces estimations ne sont pas valides.

4. METHODE SEQUENTIELLE: DETERMINATION DE LA CONSTANTE CINETIQUE D'ELIMINATION (DE PERTE) K_2

On a fait l'hypothèse que la plupart des données concernant la bioconcentration étaient «raisonnablement» bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres, comme le montre la courbe rectiligne qui relie approximativement les points représentant la concentration dans le poisson (sur un graphique logarithmique), pendant la phase d'élimination.



Remarquons que les écarts à la droite peuvent résulter d'un processus d'élimination plus complexe que celui régi par une cinétique du premier ordre. La méthode graphique peut être mise à profit pour traiter les processus d'élimination qui s'écartent d'une cinétique du premier ordre.

Pour calculer k_2 pour des temps de prélèvement multiples, il convient de réaliser une régression linéaire de \ln (concentration) par rapport au temps. La pente de la droite de régression est une estimation de la constante cinétique d'élimination k_2 ⁽¹⁾. À partir de l'ordonnée à l'origine, la concentration moyenne dans le poisson au début de la phase d'élimination ($C_{0,d}$; qui est égale à la concentration moyenne dans le poisson à la fin de la phase d'absorption) peut être facilement calculée (y compris les marges d'erreur) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{ordonn}} \quad [\text{Équation A5.21}]$$

⁽¹⁾ Dans la plupart des programmes qui permettent une régression linéaire, même les erreurs types et l'intervalle de confiance (IC) des estimations sont donnés, par exemple dans Microsoft Excel avec la commande Analyse des données.

Pour calculer k_2 quand seulement deux temps de prélèvement sont disponibles (comme dans le concept d'essai réduit), il convient de substituer les deux concentrations moyennes dans l'équation suivante

$$k_2 = \frac{\ln(C_{p1}) - \ln(C_{p2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Équation A5.22}]$$

Où $\ln(C_{p1})$ et $\ln(C_{p2})$ sont les logarithmes naturels des concentrations aux temps t_1 et t_2 , respectivement, et t_2 et t_1 correspondent aux temps auxquels les deux prélèvements ont été réalisés par rapport au début de l'élimination ⁽¹⁾.

5. METHODE SEQUENTIELLE: DETERMINATION DE LA CONSTANTE CINETIQUE D'ABSORPTION k_1 (METHODE D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE UNIQUEMENT)

Pour trouver une valeur pour k_1 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps pour la phase d'absorption, il est nécessaire d'utiliser un programme informatique qui corresponde au modèle suivant:

$$C_p(t) = C_e(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Équation A5.23}]$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, $C_p(t)$ et $C_e(t)$ sont les concentrations dans le poisson et dans l'eau, respectivement, au temps t .

Pour calculer k_1 quand seulement deux temps de prélèvement sont disponibles (comme dans le concept d'essai réduit), il convient d'utiliser la formule suivante:

$$k_1 = \frac{C_p \cdot k_2}{C_e(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Équation A5.24}]$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, C_p est la concentration dans le poisson au début de la phase d'élimination, et C_e est la concentration moyenne dans l'eau durant la phase d'absorption ⁽²⁾.

Pour évaluer la justesse de l'ajustement, on peut procéder à une inspection visuelle des pentes k_1 et k_2 par rapport aux données mesurées aux temps de prélèvement portées sur le graphique. S'il apparaît que la méthode séquentielle fournit une mauvaise estimation pour k_1 , il convient d'appliquer la méthode simultanée pour calculer k_1 et k_2 (voir la section 6 ci-après). Une nouvelle fois, pour évaluer la justesse de l'ajustement, il est nécessaire de comparer visuellement les pentes obtenues aux données mesurées portées sur le graphique. Si l'ajustement n'est toujours pas satisfaisant, cela peut signifier que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas et qu'il convient d'utiliser des modèles plus complexes.

6. METHODE SIMULTANEE DE CALCUL DES CONSTANTES CINETIQUES D'ABSORPTION ET D'ELIMINATION (PERTE) (METHODE D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE UNIQUEMENT)

Il est possible d'utiliser des programmes informatiques afin de calculer des valeurs pour k_1 et k_2 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et le modèle:

$$C_p = C_e \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Équation A5.25}]$$

$$C_p = C_e \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Équation A5.26}]$$

où

t_c = représente le temps à la fin de la phase d'absorption.

⁽¹⁾ Contrairement à la méthode de régression linéaire, cette formule ne produira pas d'erreur type pour k_2 .

⁽²⁾ Contrairement à une procédure d'ajustement linéaire, cette méthode ne produit habituellement aucune erreur type ni aucun intervalle de confiance pour la k_1 estimée.

Cette approche fournit directement des erreurs types pour les estimations de k_1 et k_2 . Si k_1/k_2 est substituée par le FBC (voir équation A5.4) dans les équations A5.25 et A5.26, il est possible d'estimer également l'erreur type et l'intervalle de confiance de 95 % du FBC. Cela est particulièrement utile pour comparer des estimations différentes résultant d'une évolution des données. La variable dépendante (concentration dans le poisson) peut être ajustée avec ou sans ln transformation, et l'incertitude quant au FBC obtenu peut être évaluée.

En raison de la forte corrélation entre les deux paramètres k_1 et k_2 , s'ils ont été estimés simultanément, on conseille éventuellement de calculer d'abord k_2 à partir des seuls résultats de l'élimination (voir précédemment); dans la plupart des cas, k_2 peut être estimé à partir de la courbe d'élimination avec une précision relativement élevée. Par la suite, k_1 peut être calculée à partir des données d'absorption avec une régression non-linéaire⁽¹⁾. Il est conseillé de transformer les données de la même façon en cas d'ajustement séquentiel.

Pour évaluer la justesse de l'ajustement, on peut procéder à une inspection visuelle des pentes obtenues en portant sur un graphique les données mesurées aux temps de prélèvement. S'il apparaît que cette méthode fournit une mauvaise estimation pour k_1 , il convient d'appliquer l'autre méthode pour calculer k_1 et k_2 . Une nouvelle fois, pour évaluer la justesse de l'ajustement, il faudrait comparer visuellement le modèle ajusté aux données mesurées portées sur le graphique, et les estimations des paramètres pour k_1 , k_2 et le FBC obtenu ainsi que leurs erreurs types et/ou les intervalles de confiance doivent être comparés selon différents types d'ajustement.

Si l'ajustement n'est toujours pas satisfaisant, cela peut signifier que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas et qu'il convient d'utiliser des modèles plus complexes. L'une des complications les plus fréquentes est le développement des poissons durant l'essai.

7. CORRECTION DE L'EFFET DE DILUTION PAR LA CROISSANCE POUR LE FBC CINÉTIQUE ET LE FBA

Cette section décrit une méthode standard pour corriger les données en fonction du développement des poissons en cours d'essai (autrement dit en fonction de l'effet de dilution par la croissance) qui est uniquement valide quand la cinétique du premier ordre s'applique. Quand il apparaît que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas, il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien pour bien corriger les données de l'effet de dilution par la croissance; on peut aussi appliquer la méthode fondée sur la masse décrite ci-après.

Dans certains cas, cette méthode de correction de l'effet de dilution par la croissance manque de précision ou ne fonctionne pas (par exemple, pour des substances s'éliminant très lentement testées chez des poissons à croissance rapide, la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance, k_{2g} , peut être très faible, aussi toute erreur commise dans les deux constantes cinétiques servant à la calculer est-elle cruciale, et dans certains cas la k_g estimée peut être supérieure à k_2). Il est alors possible d'utiliser une autre méthode (approche massique), qui évite d'apporter toute correction et fonctionne aussi en l'absence de cinétique du premier ordre. Cette méthode est présentée à la fin de cette section.

Méthode de correction de la croissance par soustraction de la constante cinétique de croissance

Selon la méthode standard, les poids et les longueurs individuels sont convertis en logarithmes naturels, et ln (poids) ou ln(1/poids) sont tracés sur deux graphiques distincts, pour le groupe témoin et le groupe d'essai, en fonction du temps (jour). On procède de même avec les données obtenues séparément pour les phases d'absorption et d'élimination. En général, pour corriger de l'effet de dilution par la croissance, il est plus approprié d'utiliser les poids de l'ensemble de l'étude pour obtenir la constante cinétique de croissance (k_g), mais des écarts notables sur un plan statistique entre les constantes cinétiques de croissance obtenues pour la phase d'absorption et la phase d'élimination peuvent indiquer qu'il convient d'employer la constante cinétique de la phase d'élimination. Les taux de croissance globaux observés lors des études avec exposition en milieu aquatique pour les groupes témoin et d'essai peuvent servir à contrôler les effets associés à tout traitement.

Une corrélation des moindres carrés linéaires est calculée pour $\ln(\text{poids des poissons})$ en fonction du temps (jour) (pour $\ln(1/\text{poids})$ en fonction du temps) pour chaque groupe (groupes d'essai et témoin, données individuelles, moyennes non journalières) pour l'ensemble de l'étude, les phases d'absorption et d'élimination en appliquant les méthodes statistiques standard. Les écarts des pentes des droites sont calculés et utilisés pour évaluer l'importance statistique ($p = 0,05$) de la différence entre les pentes (constantes cinétiques de croissance) à partir du test t (ou d'une ANOVA si plus d'une concentration est testée). On préfère en général utiliser les données sur le poids pour les corrections de la croissance. Les longueurs, traitées de la même façon, peuvent servir à comparer les effets du traitement sur les groupes témoin et d'essai. Si on ne constate aucune différence statistiquement notable lors de l'analyse des poids mesurés, on peut regrouper les données des groupes témoin et d'essai et calculer une constante cinétique de croissance du poisson globale pour l'étude (k_g) à savoir la pente globale de la corrélation linéaire. Si on observe des écarts statistiquement notables, on consignera séparément les constantes cinétiques de croissance pour chaque groupe de poissons, et/ou chaque phase de l'essai. La constante cinétique pour chaque groupe traité est alors utilisée pour les corrections de l'effet de dilution par la croissance pour ce groupe. Si on constate des différences statistiques entre les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, il convient d'utiliser les constantes cinétiques tirées de la phase d'élimination.

La constante cinétique de croissance calculée (k_g exprimée en fonction de jour^{-1}) peut être soustraite de la constante cinétique d'élimination globale (k_2) pour donner la constante cinétique d'élimination, k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Équation A5.27}]$$

On divise la constante cinétique d'absorption par la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance pour obtenir le FBC cinétique corrigé de l'effet de dilution par la croissance, représenté par FBC_{kg} (ou FBA_{kg}).

$$\text{FBC}_{kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Équation A5.28}]$$

La constante cinétique de croissance obtenue pour un essai avec exposition par voie alimentaire est utilisée dans l'équation A7.5 pour calculer le FBA_{kg} corrigé de la croissance (voir appendice 7).

Méthode de correction de la croissance fondée sur la masse

Il est possible d'utiliser une autre méthode que celle par soustraction de la constante cinétique de croissance, décrite précédemment, pour contourner la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance. Le principe consiste à utiliser les données relatives à l'élimination en fonction de la masse par poisson entier et non en fonction de la concentration.

Convertir les concentrations observées dans les tissus lors de la phase d'élimination (masse de la substance d'essai/unité de masse du poisson) en masse de substance d'essai/poisson: mettre en parallèle, sous forme de tableau, les concentrations et les poids de chaque poisson (par exemple en utilisant un tableur informatique) et multiplier chaque concentration par le poids total du poisson pour que cette mesure donne un ensemble de masse de la substance d'essai/poisson pour tous les prélèvements de la phase d'élimination.

Tracer le logarithme naturel obtenu avec les données de la masse de la substance chimique en fonction du temps (phase d'élimination) comme on le ferait normalement.

Pour la méthode d'exposition en milieu aquatique, calculer la constante cinétique d'absorption comme d'habitude (voir sections 4 et 6; noter que la valeur k_2 «normale» est utilisée dans les équations d'ajustement de la courbe pour k_1) et déduire la constante cinétique d'élimination des données ci-dessus. La valeur obtenue pour la constante cinétique d'élimination étant indépendante de la croissance, puisqu'elle découle d'une base massique par poisson entier, il convient de la représenter par k_{2g} et non par k_2 .

8. NORMALISATION DES LIPIDES A 5 % DE LA TENEUR EN LIPIDES (METHODE D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE UNIQUEMENT)

Les résultats du FBC (cinétique et à l'état stationnaire) des essais par exposition en milieu aquatique sont aussi consignés en fonction d'une teneur en lipides par défaut de 5 % du poids frais des poissons, sauf si l'on peut prouver que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides (par exemple certaines substances perfluorées peuvent se lier aux protéines). Il convient de convertir les concentrations dans les poissons, ou le FBC, en une teneur en lipides de 5 % par rapport au poids frais. Si les mêmes poissons ont été utilisés pour mesurer les concentrations de la substance et les teneurs en lipides à tous les temps d'échantillonnage, il est nécessaire de corriger les concentrations mesurées individuellement en fonction de la teneur en lipides des poissons.

$$C_{p,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_p \quad [\text{Équation A5.29}]$$

Où

$C_{p,L}$ = concentration dans le poisson normalisée par rapport aux lipides (mg kg⁻¹ du poids frais)

L = fraction lipidique (basée sur le poids frais)

C_p = concentration de la substance d'essai dans le poisson (mg kg⁻¹ du poids frais)

Si une analyse lipidique n'a pas été menée sur tous les poissons prélevés, on utilisera une valeur lipidique moyenne pour normaliser le FBC. S'agissant du FBC à l'état stationnaire, il convient d'utiliser la valeur moyenne enregistrée à la fin de la phase d'absorption dans le groupe testé. Quant à la normalisation du FBC cinétique il est parfois justifié d'appliquer une méthode différente, par exemple si la teneur en lipides a sensiblement changé pendant la phase d'absorption ou d'élimination. Cependant, il est conseillé de prévoir une ration alimentaire qui réduise au maximum tout changement spectaculaire de la teneur en lipides.

$$FBC_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot FBC_K \quad [\text{Équation A5.30}]$$

Où

FBC_{KL} = FBC cinétique normalisé par rapport aux lipides (l kg⁻¹)

L_n = fraction lipidique moyenne (basée sur le poids frais)

FBC_K = FBC cinétique (l kg⁻¹)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Chapitre C.20 de la présente annexe, *Daphnia magna*, *essai de reproduction*.
- (3) Spacie A. et Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. et Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
 - (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. et Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
 - (8) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. Février 2011. Disponible à l'adresse: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
 - (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. et Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
 - (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, États-Unis: 243-255.
 - (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. et Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
 - (12) Hawker D.W. et Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
 - (13) Konemann H. et van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

Appendice 6

ÉQUATIONS RELATIVES À L'ESSAI PAR EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE: CONCEPT D'ESSAI RÉDUIT

Les raisons de cette approche tiennent du fait que le facteur de bioconcentration dans un essai complet peut être déterminé comme un facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) en calculant le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les tissus du poisson à la concentration de la substance d'essai dans l'eau, ou en calculant le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption k_1 à la constante cinétique d'élimination k_2 . Le FBC_k est valide même si une concentration à l'état stationnaire d'une substance chimique n'est pas atteinte durant l'absorption, à condition qu'absorption et élimination soient régies pour l'essentiel par des processus cinétiques de premier ordre.

Si on mesure la concentration de la substance chimique dans les tissus (C_{p1}) à la fin de l'exposition (t_1) et qu'on mesure cette concentration dans les tissus (C_{p2}) à nouveau après un certain temps (t_2), il est possible d'estimer la constante cinétique d'élimination (k_2) avec l'équation A5.22 de l'appendice 5.

La constante cinétique d'absorption, k_1 , peut ensuite être déterminée de manière algébrique avec l'équation A5.23 de l'appendice 5 (où C_p est égale à C_{p1} et t est égal à t_1) (1). Le facteur de bioconcentration cinétique pour le concept d'essai réduit (désigné par FBC_{km} pour le distinguer des facteurs de bioconcentration cinétiques déterminés avec d'autres méthodes) correspond ainsi à:

$$FBC_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Équation A6.1]}$$

Il convient de corriger les concentrations ou les résultats de l'effet de dilution par la croissance et de les normaliser par rapport à des poissons présentant une teneur en lipides de 5 % (voir appendice 5).

Le FBC_{ES} minimisé correspond au FBC calculé à la fin de la phase d'absorption, en supposant que l'état stationnaire a été atteint. On ne peut que le supposer, puisque le nombre de temps d'échantillonnage ne suffit pas à le prouver.

$$FBC_{ES} = \frac{C_{p-minES}}{C_{e-minES}} \quad \text{[Équation A6.2]}$$

Où

$C_{p-minES}$ = Concentration dans le poisson à un état supposé stationnaire à la fin de l'absorption (mg kg^{-1} du poids frais).

$C_{e-minES}$ = Concentration dans l'eau à un état supposé stationnaire à la fin de l'absorption (mg l^{-1}).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. et Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.

Appendice 7

ÉQUATIONS RELATIVES À L'ESSAI AVEC EXPOSITION PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. Exemple de composition d'une nourriture pour poisson du commerce adaptée
2. Exemples de techniques d'enrichissement de l'alimentation
3. Calcul du rendement d'assimilation et du facteur de bioamplification
4. Correction en fonction de la teneur en lipides
5. Évaluation des différences entre la concentration mesurée au temps 0 (C0,m) et la concentration déduite au temps 0 (C0,d)
6. Orientations pour les substances d'essai s'éliminant très rapidement

1. EXEMPLE DE COMPOSITION D'UNE NOURRITURE POUR POISSON DU COMMERCE ADAPTEE

| Composant | Part de l'alimentation |
|----------------------|-------------------------|
| Protéines brutes | ≤ 55,0 % |
| Matière grasse brute | ≤ 15,0 % ⁽¹⁾ |
| Cellulose brute | ≥ 2,0 % |
| Humidité | ≥ 12 % |
| Cendres | ≥ 8 % |

⁽¹⁾ Dans certaines régions, il est possible qu'on ne puisse obtenir que de la nourriture pour poisson dont la teneur en lipides est très inférieure à ce plafond. Le cas échéant, il convient de réaliser un essai avec cette teneur en lipides plus faible, et d'ajuster la ration alimentaire pour maintenir les poissons en bonne santé. Il est préférable de ne pas augmenter artificiellement la teneur en lipides de l'alimentation en ajoutant trop d'huile.

2. EXEMPLES DE TECHNIQUES D'ENRICHISSEMENT DE L'ALIMENTATION

Généralités

La nourriture témoin est préparée exactement de la même façon que la nourriture enrichie, mais sans ajout de la substance d'essai.

Pour connaître les concentrations dans les aliments traités, il convient d'extraire trois échantillons de la ration alimentaire selon une méthode d'extraction adaptée, puis de mesurer la radioactivité ou la concentration de la substance d'essai dans ces échantillons. La possibilité d'isoler la substance d'essai à analyser (>85 %) ainsi que la faible variation entre les échantillons (trois concentrations de la substance mesurées sur des échantillons prélevés au début de l'essai ne varient pas de plus de ± 15 % de la moyenne) sont démontrées.

Au cours de l'essai avec exposition par voie alimentaire, il convient de collecter trois échantillons de nourriture au jour 0 et à la fin de la phase d'absorption pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les aliments

Préparation de la nourriture pour poisson avec une substance d'essai liquide (pure)

On fixe une concentration d'essai nominale cible dans la nourriture traitée, par exemple 500 µg de substance d'essai/g de nourriture. La quantité appropriée (en fonction de la masse molaire ou radioactivité spécifique) de la substance d'essai pure est ajoutée à une masse connue de nourriture pour poisson dans un bocal en verre ou un ballon évaporateur rotatif. Il convient que la masse de nourriture suffise pour toute la durée de la phase d'absorption (prendre en compte la nécessité d'augmenter chaque ration en raison du développement des poissons). La nourriture pour poisson et la substance d'essai sont mélangées lentement pendant la nuit (par exemple au moyen d'un mixeur Roto-Rack ou, en cas d'utilisation d'un ballon évaporateur rotatif, par rotation). La nourriture enrichie est stockée dans des conditions qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange (par réfrigération par exemple) jusqu'à son utilisation.

Préparation de la nourriture pour poisson avec un véhicule (huile de poisson/germes de maïs)

Les substances d'essai solides sont pilées dans un mortier en une fine poudre. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement à l'huile de poisson ou de germes de maïs. La substance d'essai est dissoute dans une quantité connue d'huile de poisson ou de germes de maïs (par exemple entre 5 à 15 ml). L'huile dosée est transférée dans un ballon d'évaporation rotatif de taille appropriée. La fiole utilisée pour préparer l'huile dosée est nettoyée avec deux petites aliquotes d'huile qu'on ajoute ensuite dans le ballon pour veiller à ce que toute la substance d'essai dissoute soit bien transférée. Afin de garantir la dissolution/dispersion complète dans l'huile (ou si plus d'une substance d'essai est utilisée durant l'essai), on ajoute un micro-agitateur et on bouche la fiole pour que le mélange puisse être agité rapidement pendant la nuit. On ajoute une quantité appropriée de nourriture pour poisson (habituellement sous forme de granulés) dans le ballon, et le contenu du ballon de verre est mélangé de façon homogène par rotation continue du ballon pendant au moins 30 minutes, mais de préférence pendant toute la nuit. La nourriture enrichie est ensuite stockée de manière adéquate (réfrigérée par exemple) pour assurer la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture jusqu'à son utilisation.

Préparation de la nourriture pour poisson avec un solvant organique

Une quantité appropriée de la substance d'essai (en fonction de la masse molaire ou radioactivité spécifique) suffisante pour atteindre la dose cible est dissoute dans un solvant organique adéquat (par exemple cyclohexane ou acétone; de 10 à 40 ml, ou un volume plus important si nécessaire, selon la quantité de nourriture à enrichir). Une aliquote, voire la totalité (ajoutée en plusieurs fois), de cette solution est mélangée à la masse appropriée de nourriture pour poisson, de façon à atteindre la dose nominale requise pour l'essai. On peut mélanger la nourriture pour poisson et la substance d'essai dans un récipient en acier inoxydable et laisser la nourriture fraîchement dosée dans ce récipient dans une hotte de laboratoire pendant deux jours (en agitant de temps en temps) pour permettre à l'excès de solvant de s'évaporer; on peut aussi effectuer ce mélange dans un ballon évaporateur à rotation continue. Si besoin, l'excès de solvant peut être retiré au moyen d'un courant d'air ou d'azote. Il convient de veiller à ce que la substance d'essai ne cristallise pas lors du retrait du solvant. Il convient que la nourriture enrichie soit stockée dans des conditions (par réfrigération par exemple) qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange jusqu'à son utilisation.

3. CALCUL DU RENDEMENT D'ASSIMILATION ET DU FACTEUR DE BIOAMPLIFICATION

Pour calculer le rendement d'assimilation, il convient tout d'abord d'estimer la constante cinétique d'élimination globale comme indiqué à la section 4 de l'appendice 5 (avec la méthode séquentielle, c'est-à-dire avec une régression linéaire standard) à partir des concentrations moyennes mesurées dans les échantillons prélevés lors de la phase d'élimination. La constante de la ration alimentaire, I , et la durée d'absorption, t , sont des paramètres connus de l'étude. $C_{\text{alim},t}$, la concentration mesurée moyenne de la substance d'essai dans la nourriture, est une variable mesurée lors de l'étude. $C_{0,d}$, la concentration de la substance d'essai dans le poisson à la fin de la phase d'absorption, est habituellement donnée par l'ordonnée à l'origine sur le tracé de $\ln(\text{concentration})$ en fonction du jour d'élimination.

Le rendement d'assimilation de la substance chimique (a , absorption de la substance d'essai par voie intestinale) est calculé comme suit:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{alim}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Équation A7.1}]$$

Où:

$C_{0,d}$ = concentration dans le poisson obtenue au temps 0 de la phase d'élimination (mg kg^{-1});

k_2 = constante cinétique d'élimination (non corrigée de la croissance) globale (jour^{-1}), calculée avec les équations présentées à l'appendice 5, section 3;

I = constante cinétique d'ingestion ($\text{g de nourriture g}^{-1}$ de poisson jour^{-1});

C_{alim} = concentration dans la nourriture (mg kg^{-1} de nourriture);

t = durée de la période d'alimentation (jour)

Néanmoins, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la ration alimentaire, I , utilisée dans les calculs en fonction du développement des poissons pour donner un rendement d'assimilation, a , précis. Dans un essai où les poissons se développent de façon notable pendant la phase d'absorption (durant laquelle on ne corrige jamais la quantité de nourriture afin de maintenir la ration alimentaire fixée), la ration alimentaire réelle à mesure que la phase d'absorption progresse sera inférieure à celle fixée, donnant lieu à un rendement d'assimilation «réel» supérieur. (Cet aspect n'est pas important pour les calculs généraux du FBA, puisque les termes I s'annulent entre les équations A7.1 et A7.4). La ration alimentaire moyenne corrigée de l'effet de dilution par la croissance, I_g , peut être déduite de plusieurs façons, mais une méthode simple et rigoureuse consiste à utiliser la constante cinétique de croissance (k_g) connue pour estimer les poids des poissons testés à certains temps de la phase d'absorption, soit:

$$P_p(t) = P_{p,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{Équation A7.2}]$$

où

$P_p(t)$ = poids moyen des poissons au jour t de la phase d'absorption

$P_{p,0}$ = poids moyen des poissons au début de l'expérience

De cette manière (au moins), on peut estimer le poids moyen des poissons au dernier jour d'exposition ($P_{p,fin-absorption}$). La ration alimentaire ayant été fixée par rapport à $P_{p,0}$, la ration alimentaire réelle pour chaque jour d'absorption peut être calculée en utilisant ces deux valeurs relatives au poids. La ration alimentaire corrigée de la croissance, I_g ($\text{g de nourriture g}^{-1}$ de poisson jour^{-1}), qu'il convient d'utiliser à la place de I en cas de développement rapide durant la phase d'absorption, peut ensuite être calculée avec:

$$I_g = \frac{I \times P_{p,0}}{P_{p,fin-absorption}} \quad [\text{Équation A7.3}]$$

Une fois le rendement d'assimilation obtenu, on peut calculer le FBA en le multipliant par la constante de la ration alimentaire I (ou I_g , si cette dernière a servi à calculer a) et en divisant le produit par la constante cinétique d'élimination globale k_2 :

$$FBA = \frac{I \times a}{k_2} \quad [\text{Équation A7.4}]$$

Le facteur de bioamplification corrigé de la croissance est calculé de la même façon, en utilisant la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (obtenue comme indiquée à la section 7 de l'appendice 5). Une nouvelle fois, si I_g a servi à calculer a , il convient de l'utiliser à la place de I :

$$FBA = \frac{I \times a}{k_{2g}} \quad [\text{Équation A7.5}]$$

Où:

α = rendement d'assimilation (absorption de la substance d'essai par voie intestinale);

k_2 = constante cinétique d'élimination (non corrigée de la croissance) globale (jour⁻¹), calculée avec les équations présentées à l'appendice 5, section 3;

k_{2g} = constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (jour⁻¹);

I = constante cinétique d'ingestion (g de nourriture g⁻¹ de poisson jour⁻¹);

La demi-vie corrigée de la croissance ($t_{1/2}$) est calculée comme suit.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Équation A7.6}]$$

Le rendement d'assimilation de la substance chimique comprise dans la nourriture peut aussi être estimé si les résidus présents dans les tissus sont déterminés durant la phase linéaire de la phase d'absorption (entre les jours 1 et 3). On peut alors déterminer le rendement d'assimilation de la substance (α) comme suit:

$$\alpha = \frac{C_p(t)}{I \times C_{alim} \times t} \quad [\text{Équation A7.7}]$$

Où

$C_p(t)$ = la concentration de la substance d'essai dans le poisson au temps t (mg kg⁻¹ de poids frais).

4. CORRECTION EN FONCTION DE LA TENEUR EN LIPIDES

Si la teneur en lipides a aussi été mesurée dans les poissons soumis à l'analyse chimique à tous les temps de prélèvement, alors il convient de corriger les concentrations individuelles en fonction des lipides et de tracer \ln (concentration, corrigé de la teneur en lipides) par rapport à l'élimination (jour) pour obtenir $C_{0,d}$ et k_2 . Le rendement d'assimilation (équation A7.1) peut ensuite être calculé en fonction des lipides en utilisant C_{alim} (C_{alim} est multipliée par la fraction moyenne de lipides dans la nourriture). Des calculs complémentaires avec les équations A7.4 et A7.5 donneront le FBA corrigé de la teneur en lipides (et de l'effet de dilution par la croissance) directement.

Dans le cas contraire, les fractions lipidiques moyennes (poids frais) dans le poisson et dans les aliments sont déduites pour les deux groupes, témoin et traité (s'agissant de la nourriture et des poissons du groupe témoin, cette fraction est déduite à partir des mesures relevées au début et à la fin de l'exposition; pour le groupe traité, elle découle habituellement des mesures relevées uniquement à la fin de l'exposition). Dans certaines études, la teneur en lipides du poisson peut augmenter sensiblement; il est alors préférable d'appliquer une concentration moyenne des lipides dans le poisson testé calculée à l'aide des valeurs mesurées à la fin de l'exposition et à la fin de l'élimination. En général, les données du groupe d'essai servent uniquement à obtenir les deux fractions lipidiques.

Le facteur de correction de la teneur en lipides (L_c) est calculé ainsi:

$$L_c = \frac{L_p}{L_{alim}} \quad [\text{Équation A7.8}]$$

Où L_p et L_{alim} sont les fractions lipidiques moyennes respectivement dans le poisson et dans la nourriture.

Le facteur de correction de la teneur en lipides sert à calculer le facteur de bioamplification corrigé par rapport aux lipides (FBA_L):

$$FBA_L = \frac{FBA}{L_c} \quad [\text{Équation A7.9}]$$

5. ÉVALUATION DES DIFFERENCES ENTRE LA CONCENTRATION MESURÉE AU TEMPS 0 ($C_{0,m}$) ET LA CONCENTRATION DEDUITE AU TEMPS 0 ($C_{0,d}$)

Il convient de comparer la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) et la concentration déduite au temps 0 ($C_{0,d}$). Si elles sont très similaires, le modèle du premier ordre utilisé pour obtenir les paramètres d'élimination semble approprié.

Dans certaines études, on observera une différence notable entre la valeur déduite au temps 0, $C_{0,d}$, et la concentration moyenne mesurée au temps 0, $C_{0,m}$ (voir le dernier point du paragraphe 159 de la présente méthode d'essai). Si $C_{0,d}$ est nettement inférieur à $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), cet écart peut indiquer la présence, dans les intestins, d'aliments enrichis non digérés. Pour le savoir, on peut analyser séparément des intestins excisés si des poissons (entiers) supplémentaires ont été prélevés et stockés à la fin de la phase d'absorption. Dans le cas contraire, s'il apparaît à l'issue d'un test du point aberrant statistiquement valide appliqué à la régression linéaire de la phase d'élimination que le premier temps d'échantillonnage de l'élimination est erronément élevé, il peut être pertinent de poursuivre la régression linéaire pour obtenir k_2 mais en omettant la concentration au premier temps de l'élimination. Si la régression linéaire semble nettement moins incertaine et que le processus d'élimination semble manifestement régi par une cinétique du premier ordre, il peut être approprié d'utiliser les valeurs $C_{0,d}$ et k_2 obtenues avec le calcul du rendement d'assimilation. Il faudra alors le justifier dûment dans le rapport d'essai. Il est également possible que la phase d'élimination ne soit pas régie par une cinétique du premier ordre. Si cette hypothèse est probable (le logarithme naturel formé à partir des données obtenues semble suivre une courbe par rapport à la droite de la régression linéaire), il est peu probable que les calculs de k_2 et $C_{0,d}$ soient valides, et il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien.

Si $C_{0,d}$ est nettement supérieure à la valeur mesurée ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$) cela peut signifier: que la substance a été éliminée très rapidement (le temps d'échantillonnage se rapproche très tôt de la limite de quantification de la méthode analytique lors de la phase d'élimination, voir la section 6 ci-après); que le processus d'élimination n'est pas régi par une cinétique du premier ordre; que la régression linéaire pour obtenir k_2 et $C_{0,d}$ est erronée; ou qu'un problème concernant les concentrations mesurées lors de l'étude est survenu à certains temps de prélèvement. Il est alors nécessaire d'examiner le tracé de la régression linéaire pour identifier les prélèvements sur ou près de la limite de quantification, les points aberrants et toute courbure manifeste (suggérant une élimination non régie par une cinétique du premier ordre), et de les indiquer clairement dans le rapport d'essai. Toute réévaluation ultérieure de la régression linéaire visant à améliorer les valeurs estimées devra être décrite et justifiée. Si on observe une déviation notable de la cinétique du premier ordre, il est peu probable que les calculs de k_2 et $C_{0,d}$ soient valides, et il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien.

6. ORIENTATIONS POUR LES SUBSTANCES D'ESSAI S'ÉLIMINANT TRÈS RAPIDEMENT

Comme mentionné au paragraphe 129 de la méthode d'essai, certaines substances s'éliminent si vite qu'il n'est possible de déduire ni une concentration fiable au temps 0, $C_{0,d}$, ni k_2 parce que très tôt durant la phase d'élimination (dès le deuxième prélèvement de l'élimination) la substance n'est plus réellement mesurée (concentrations à la limite de quantification). Cette situation, observée lors de l'essai comparatif interlaboratoires avec du benzo [a]pyrène, a été consignée dans le rapport de validation de cette méthode d'essai. Dans ce cas de figure, il n'est pas possible de poursuivre la régression linéaire de manière fiable, car elle donnerait probablement une estimation exagérément élevée de $C_{0,d}$, d'où un rendement d'assimilation en apparence nettement supérieur à 1. On peut alors procéder à une estimation basse de k_2 et borner le FBA supérieurement.

En utilisant ces points de la phase d'élimination où une concentration a été mesurée, première concentration non détectée incluse (concentration fixée à la limite de quantification), une régression linéaire (fondée sur les concentrations transformées en logarithme naturel par rapport au temps) donnera une estimation de k_2 . Cela impliquera souvent uniquement deux points (par exemple les jours de prélèvement 1 et 2 de l'élimination) et k_2 pourra ensuite être estimée avec l'équation A5.22 présentée à l'appendice 5. Cette estimation de k_2 peut servir à estimer un rendement d'assimilation avec l'équation A7.1, en remplaçant dans cette équation la valeur $C_{0,d}$ par la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) quand d'après les estimations $C_{0,d}$ est nettement supérieure à ce que cet essai aurait permis d'atteindre. Si $C_{0,m}$ n'était pas mesurable, il convient d'utiliser le seuil de détection dans les tissus du poisson. Si, dans certains cas, cela donne une valeur $\alpha > 1$, alors un rendement d'assimilation de 1 est supposé être le «pire cas de figure».

Le FBak maximum peut alors être estimé avec l'équation A7.4 et devra être indiqué comme une valeur «nettement inférieure à» (<<). Par exemple, pour une étude menée avec une ration alimentaire de 3 % et une demi-vie d'élimination inférieure à 3 jours, et un «pire cas de figure» α de 1, le FBak risque d'être inférieur à environ 0,13. Étant donné l'objet de cette estimation et le fait que les valeurs seront basses par nature, il n'est pas nécessaire de les corriger de l'effet de dilution par la croissance ou de la teneur en lipides dans le poisson ou la nourriture.

Appendice 8

MÉTHODES POUR ESTIMER DES FBC PROVISOIRES À PARTIR DES DONNÉES COLLECTÉES DANS L'ÉTUDE AVEC EXPOSITION PAR VOIE ALIMENTAIRE

La méthode d'exposition par voie alimentaire est présentée dans la présente méthode d'essai pour l'essai de bioaccumulation impliquant des substances impossibles à tester avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique. La méthode d'exposition via le milieu aquatique donne un facteur de bioconcentration, alors que celle par voie alimentaire fournit directement des informations sur le potentiel de bioamplification de la nourriture. De nombreux plans relatifs à la sécurité des produits chimiques requièrent des informations sur la bioconcentration aquatique (par exemple pour le système d'évaluation des risques ou le Système général harmonisé de classification). Aussi est-il nécessaire d'utiliser les données obtenues avec une étude d'exposition par voie alimentaire pour estimer un facteur de bioconcentration qui soit comparable aux essais menés selon la méthode d'exposition via le milieu aquatique ⁽¹⁾. Cette section examine différentes approches en ce sens, tout en reconnaissant les limites inhérentes à ces estimations.

L'étude par voie alimentaire mesure l'élimination pour donner une constante cinétique d'élimination, k_2 . Si une constante cinétique d'absorption peut être estimée avec les données disponibles quand le poisson a été exposé à la substance d'essai dans l'eau, on pourra estimer un FBC cinétique.

L'estimation d'une constante cinétique d'absorption pour l'exposition via le milieu aquatique à une substance d'essai repose sur de nombreuses hypothèses, toutes contribuant à l'incertitude des estimations. De plus, cette méthode d'estimation d'un FBC suppose que la cinétique d'élimination globale (y compris les facteurs contributifs tels que la répartition dans le corps et les processus d'élimination individuels) est indépendante de la technique d'exposition utilisée pour produire une charge corporelle de la substance d'essai.

On peut résumer les principales hypothèses inhérentes à cette méthode d'estimation comme suit:

L'élimination suivant l'absorption par voie alimentaire procède de même que suivant l'exposition via le milieu aquatique pour une substance donnée

L'absorption par exposition via le milieu aquatique est régie par une cinétique du premier ordre

Selon la méthode utilisée pour estimer l'absorption:

- l'absorption peut être corrélée au seul poids du poisson;
- l'absorption peut être corrélée au seul coefficient de partage octanol-eau de la substance;
- l'absorption peut être corrélée à une combinaison du poids du poisson et du coefficient de partage octanol-eau de la substance
- les facteurs pouvant affecter l'absorption lors d'un essai par exposition en milieu aquatique tels que la biodisponibilité de la substance, l'adsorption vers l'appareillage, la taille moléculaire etc. ont peu d'impact
- et, surtout:

La base de données utilisée pour développer la méthode d'estimation de l'absorption est représentative de la substance considérée

Plusieurs publications dans la littérature ont déduit des équations faisant le rapprochement entre l'absorption, depuis le milieu aquatique, de la substance par les branchies et un coefficient de partage octanol-eau de la substance, le poids du poisson (1) (2) (3) (4), le volume et/ou la teneur en lipides, l'imprégnation/diffusion par les membranes (5) (6), le volume de ventilation du poisson (7) et par une approche fugacité/bilan massique (8) (9) (10). Ces méthodes, appliquées dans ce contexte, sont évaluées en détail par Crookes et Brooke (11). Une publication de Barber (12), qui s'est attaché à modéliser la bioaccumulation associée à l'absorption par voie alimentaire, s'avère aussi utile dans ce contexte, puisqu'elle inclut les contributions de modèles de cinétique d'absorption par les branchies. Une section dans le document de référence du protocole de 2004 (13) est aussi consacrée à cet aspect.

⁽¹⁾ Dans la nature, l'ingestion est probablement le meilleur moyen d'exposer au maximum des poissons à des substances très hydrophobes dans un milieu aquatique; ainsi, un FBC estimé n'est pas strictement représentatif du potentiel de bioaccumulation d'une telle substance.

Pour la plupart, ces modèles semblent dériver de bases de données limitées. S'agissant des modèles dont les bases de données sont présentées en détail, il semble que les types de substances utilisés présentent souvent une structure similaire ou relèvent de la même classe (en termes de fonctionnalité, par exemple les composés organochlorés). Cela ajoute à l'incertitude qu'il y a à utiliser un modèle dans le but de prédire une constante cinétique d'absorption pour un type de substance différent, sans parler des considérations spécifiques à l'essai comme l'espèce testée, les températures en présence, etc.

Une synthèse des techniques disponibles (11) montre qu'aucune méthode n'est «plus juste» que les autres. Aussi convient-il de justifier clairement le choix du modèle utilisé. Quand plusieurs méthodes sont justifiées, il est prudent de présenter plusieurs estimations de k_1 (et donc du FBC) ou une fourchette de valeurs pour k_1 (et pour le FBC) selon les différentes méthodes d'estimation d'absorption possibles. Néanmoins, étant donné les différences entre les types de modèle et les bases de données utilisées pour les développer, il ne serait pas approprié de prendre une moyenne des estimations obtenues avec ces différentes méthodes.

Certains chercheurs posent comme postulat que ces estimations du FBC exigent une correction en fonction de la biodisponibilité pour tenir compte de l'adsorption d'une substance chimique par rapport au carbone organique dissous (COD) dans un milieu aquatique, afin que l'estimation corresponde aux résultats des études d'exposition en milieu aquatique [par exemple (13) (14)]. Cette correction n'est toutefois pas forcément appropriée en raison des faibles niveaux de COD requis dans une étude avec exposition en milieu aquatique pour une estimation dans le «pire cas de figure» (à savoir le ratio entre la substance biodisponible et la substance mesurée dans la solution). Avec les substances très hydrophobes, l'absorption par les branchies peut être limitée par le taux de diffusion passive près des ouïes; dans ce cas, il est possible que la correction tienne plus compte de cet effet que de son objet initial.

Il est conseillé de s'intéresser aux méthodes qui nécessitent des données facilement disponibles sur les substances testées dans l'étude avec exposition par voie alimentaire décrite ici (à savoir le log K_{oc} , et le poids des poissons). D'autres méthodes nécessitant des informations plus complexes peuvent s'appliquer, mais impliqueront de procéder à des mesures supplémentaires durant l'essai ou de disposer d'informations détaillées sur la substance d'essai ou sur l'espèce testée difficiles à obtenir. En outre, le choix du modèle peut être influencé par le niveau de validation et le domaine d'applicabilité [voir (11) pour une synthèse et une comparaison des différentes méthodes].

Il convient de garder à l'esprit que l'estimation de k_1 obtenue, et le FBC estimé, n'est pas sûre et peut nécessiter d'appliquer le poids de la preuve au FBA obtenu et aux paramètres relatifs à la substance (taille moléculaire par exemple) pour avoir une vue d'ensemble du potentiel de bioaccumulation d'une substance. L'interprétation et l'utilisation de ces paramètres peuvent varier en fonction du cadre réglementaire.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. et Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. et Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
 - (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
 - (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. et Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
 - (9) Campfens J. et Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
 - (10) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
 - (11) Crookes M. et Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
 - (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
 - (13) Anonymou (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
 - (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231.»
-

▼BC.14. **POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVÉNILES**1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité sur la croissance des juvéniles reprend la ligne directrice n° 215 de l'OCDE (2000).

1.1. **INTRODUCTION**

Cet essai vise à évaluer les effets d'une exposition prolongée à des produits chimiques sur la croissance des poissons au stade juvénile. Il s'appuie sur une méthode mise au point et soumise à des essais tournants (1) (3) dans l'Union européenne, qui a pour objet d'évaluer les effets de substances chimiques sur la croissance de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au stade juvénile dans des conditions dynamiques. D'autres espèces de poissons bien étudiées peuvent être utilisées. Par exemple, on possède une certaine expérience des essais de croissance sur le danio (*Danio rerio*)⁽¹⁾ (2) (4) (5) et sur le medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

Voir aussi introduction générale, partie C.

1.2. **DÉFINITIONS**

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): la plus faible concentration de la substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p < 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CMEO.

Concentration sans effet observé (CSEO): la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

CE_x: dans la méthode décrite pour cet essai, la concentration de la substance d'essai qui provoque une variation de x % du taux de croissance des poissons par rapport aux témoins.

Taux de charge: le poids frais des poissons par unité de volume d'eau.

Densité de peuplement: le nombre de poissons par unité de volume d'eau.

Taux de croissance spécifique de chaque poisson: le taux de croissance d'un individu par rapport à son poids initial.

Taux de croissance spécifique moyen par récipient: le taux de croissance moyen de la population d'un récipient (cuve) à une concentration donnée.

Taux de croissance pseudo-spécifique: le taux de croissance individuel comparé au poids initial moyen de la population du récipient.

⁽¹⁾ Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, p. 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Des juvéniles en phase de croissance exponentielle sont pesés, puis placés dans des enceintes expérimentales où ils sont exposés à une gamme de concentrations sublétales de la substance d'essai dissoute dans l'eau, de préférence dans des conditions dynamiques ou, à défaut, dans des conditions semi-statiques (renouvellement discontinu) adéquates. L'essai dure 28 jours. Les poissons sont nourris quotidiennement. La ration alimentant est déterminée en fonction du poids initial des poissons et peut être recalculée après 14 jours. On pèse à nouveau les poissons à la fin de l'essai. Les effets sur le taux de croissance sont analysés à l'aide d'un modèle de-régression afin d'estimer la concentration qui provoquerait une variation de x % du taux de croissance, soit CE_x (CE_{10} , CE_{20} ou CE_{30} par exemple). Les données peuvent aussi être comparées aux valeurs des témoins pour déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO).

1.4. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir méthode d'essai C.1) réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Cela implique que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et que l'on dispose d'une méthode d'analyse fiable pour déterminer la quantité de substance dans les solutions d'essai avec une précision et une limite de détection connues et mentionnées dans le rapport.

Il est utile de connaître la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a , le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode d'essai C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

- la mortalité dans le(s) groupe(s) témoin(s) ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,
- le poids moyen des poissons du (des) groupe(s) témoin(s) doit avoir augmenté suffisamment pour que la variation minimale du taux de croissance qui est jugée significative soit détectable. Un essai tournant (2) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, le poids moyen des poissons dans les groupes témoins doit avoir au moins doublé (soit 50 %) par rapport à leur poids moyen initial sur 28 jours; par exemple, poids initial: 1 g/poisson (= 100 %), poids final après 28 jours: > 1,5 g/poisson (> 150 %),
- la concentration de l'oxygène dissous doit se situer à au moins 60 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai,
- à aucun moment, durant l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de ± 1 °C entre les enceintes expérimentales et devrait être maintenue dans un intervalle de 2 °C compris dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (voir appendice 1).

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

On utilise du matériel courant de laboratoire et notamment:

- a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;

▼B

- b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;
- c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;
- d) des récipients (cuves) fabriqués en un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir point 1.8.5 et appendice 1);
- e) une balance suffisamment précise (précision de $\pm 0,5$ %).

1.6.2. Eau

Toute eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux de survie et de croissance à long terme adéquates peut être utilisée pour l'essai. Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau sera compris dans un intervalle de 6,5 à 8,5 unités, mais sans varier de plus de $\pm 0,5$ unité (de pH) au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (CaCO_3) est recommandée. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), en principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4 , par exemple), en pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, par exemple), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que la qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante durant au moins un an, on pourra espacer les déterminations (par exemple tous les 6 mois). Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 2.

1.6.3. Solutions d'essai

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitateur ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée.

L'emploi de solvants ou de dispersants (agents solubilisants) peut être indiqué dans certains cas pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsqu'on utilise des agents facilement biodégradables (comme l'acétone) et/ou des composés très volatils car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. Lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il ne doit pas avoir d'effet significatif sur la croissance des poissons ni d'effets nocifs visibles sur les juvéniles, ce que révélera l'observation d'un témoin ne comprenant que le solvant.

▼B

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, au cours de l'essai, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de celui-ci. Un essai tournant (3) a montré que, pour la truite arc-en-ciel, une fréquence de renouvellement de l'eau au cours de l'essai de 6 litres/g de poisson/jour était acceptable (voir point 1.8.2.2).

S'agissant des essais semi-statiques (essais avec renouvellement), la fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si des essais de stabilité préliminaires (voir point 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort d'un intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou qu'elle tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudra envisager de pratiquer un essai dynamique.

1.6.4. Sélection de l'espèce

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est recommandée dans cet essai car c'est à propos de cette espèce que l'on a acquis la plus grande expérience au cours d'essais tournants (1) (3). D'autres espèces bien étudiées peuvent cependant être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Par exemple, on dispose également d'une certaine expérience au sujet du danio (*Danio rerio*) (4) (5) et du medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Dans ce cas, le choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doit être justifié.

1.6.5. Soins des poissons

Les poissons d'essai seront sélectionnés au sein d'une même population, issue de préférence du même frai, qui aura été gardée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'illumination similaires à celles de l'essai. Ils devraient recevoir une ration alimentaire quotidienne atteignant au moins 2 % de leur poids corporel et de préférence 4 % pendant toute la durée des soins et de l'essai.

Après une période de mise en condition de 48 heures, on mesure la mortalité et on applique les critères suivants:

- mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté,
- mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: période d'acclimatation prolongée de sept jours, si la mortalité dépasse 5 % pendant la deuxième période de sept jours, le lot entier est rejeté,
- mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.

Les poissons ne devraient pas recevoir un traitement pour une maladie durant les deux semaines précédant l'essai ou pendant l'essai.

▼B

1.7. CONCEPTION DE L'ESSAI

Par «conception de l'essai», on entend le choix du nombre et de l'espacement des concentrations d'essai, le nombre de récipients par concentration et le nombre de poissons par récipient. Idéalement, l'essai devrait être conçu en fonction de:

- a) l'objectif de l'étude;
- b) la méthode d'analyse statistique qui sera utilisée;
- c) la disponibilité et le coût des ressources expérimentales.

L'énoncé de l'objectif devrait, si possible, spécifier la puissance statistique que requiert une différence donnée (par exemple, dans le taux de croissance) pour être détectée, ou encore la précision avec laquelle la CE, doit être fournie (avec $x = 10, 20$ ou 30 , par exemple et de préférence pas au-dessous de 10) pour être estimée. Faute de quoi il est impossible de donner une indication précise de l'échelle de l'étude.

Il importe de reconnaître qu'une conception qui est optimale (qui tire le meilleur parti des ressources) lorsqu'on utilise une certaine méthode d'analyse statistique ne l'est pas nécessairement avec une autre méthode. La conception recommandée pour l'estimation d'une CMEO/CSEO ne sera donc pas identique à celle recommandée pour une analyse par régression.

Dans la plupart des cas, l'analyse par régression est préférable à l'analyse de la variance, pour des raisons exposées par Stephan et Rogers (9) Cependant, si on ne trouve aucun modèle de régression adéquat ($r^2 < 0,9$), il faut recourir à la CSEO/CMEO.

1.7.1. **Conception pour l'analyse par régression**

Les considérations importantes pour la conception d'un essai à analyser par régression sont les suivantes:

- a) La concentration avec effet (par exemple, $CE_{10, 20, 30}$) et la gamme de concentrations dans laquelle la substance d'essai produit un effet intéressant doivent nécessairement être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. La précision avec laquelle les concentrations produisant un effet peuvent être estimées sera la meilleure lorsque la concentration avec effet se trouve au milieu de la plage des concentrations testées. Un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut s'avérer utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.
- b) Pour satisfaire les conditions de la modélisation statistique, l'essai doit comporter au moins un récipient témoin et cinq autres à différentes concentrations. Le cas échéant, lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il faudrait étudier un groupe témoin contenant l'agent solubilisant à la concentration d'essai la plus élevée en plus des groupes d'essai (voir paragraphes 1.8.3 et 1.8.4).
- c) Une série géométrique ou logarithmique appropriée (10) (voir appendice 3) peut être utilisée. Un espacement logarithmique entre les concentrations d'essai est préférable.

▼B

d) Si on dispose de plus de six récipients, les récipients supplémentaires devraient servir de répliques ou être répartis dans la gamme des concentrations de manière à diminuer l'espacement entre les concentrations. Ces deux mesures sont aussi valables l'une que l'autre.

1.7.2. Conception pour l'estimation de la CSEO/CMEQ à l'aide de l'analyse de la variance

Il serait préférable d'avoir plusieurs récipients répliques pour chaque concentration, et d'effectuer l'analyse statistique au niveau du récipient (11). Sans récipients répliques, il est impossible de prendre en compte la variabilité entre les récipients en plus de celle qui existe d'un poisson à l'autre. L'expérience a cependant montré (12) que la variabilité entre les récipients était très inférieure à celle qui existe au sein de chaque récipient (autrement dit, entre les poissons) dans le cas examiné. C'est pourquoi une alternative relativement acceptable consiste à effectuer l'analyse statistique au niveau de chaque poisson.

On doit normalement utiliser au moins cinq concentrations d'essai selon une série géométrique obéissant à un facteur qui ne dépasse pas de préférence 3.2.

Généralement, lorsque les essais sont conduits dans des récipients répliques, le nombre de récipients témoins répliques, et par conséquent le nombre de poissons, devrait être le double du nombre choisi à chaque concentration d'essai, qui devrait être toujours le même (13) (14) (15). A contrario, sans récipients répliques, le nombre de poissons dans le groupe témoin devrait être le même que dans chaque concentration d'essai.

Si l'analyse de la variance est conduite au niveau des récipients plutôt qu'à celui des poissons [ce qui exigerait un marquage individuel des poissons ou l'utilisation de taux de croissance «pseudo-spécifiques» (voir paragraphe 2.1.2)], il faut un nombre suffisant de récipients répliques pour pouvoir déterminer l'écart-type entre les «récipients de même concentration». Ce qui signifie que l'erreur dans l'analyse de la variance ait au moins 5 degrés de liberté (11). Si seuls les témoins ont des répliques, la variabilité de l'erreur risque d'être faussée puisqu'elle pourrait s'accroître avec la valeur moyenne du taux de croissance en question. Comme le taux de croissance a des chances de diminuer lorsque la concentration augmente, on aura tendance à surestimer la variabilité.

1.8. MODE OPÉRATOIRE**1.8.1. Sélection et pesée des poissons d'essai**

Il importe que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. On trouvera à l'appendice 1 les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Idéalement, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble du lot de poissons utilisés dans l'essai devrait rester comprise dans un intervalle de ± 10 % de la moyenne arithmétique et en aucun cas excéder 25 %. Il est recommandé de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

▼B

Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent le début de l'essai. Ils sont ensuite choisis au hasard. À l'aide d'un anesthésique général [par exemple, une solution aqueuse de 100 mg/litre de méthanesulphonate de tricaine (MS 222) neutralisée par l'adjonction de deux parts de bicarbonate de sodium par part de MS 222], les poissons doivent être pesés individuellement en poids frais (*blotted dry*, poissons essuyés) avec la précision indiquée à l'appendice 1. Les poissons dont le poids se situe à l'intérieur de l'intervalle voulu seront retenus puis répartis au hasard entre les récipients d'essai. On notera le poids frais (*wet weight*) total des poissons dans chaque récipient, l'utilisation d'anesthésique de même que la manipulation des poissons (y compris le séchage et la pesée) peuvent stresser et blesser les jeunes poissons, en particulier les espèces de petite taille. Les juvéniles doivent donc être manipulés avec la plus grande précaution afin d'éviter de stresser et de blesser les animaux testés.

Les poissons sont pesés à nouveau le 28^e jour de l'essai (voir point 1.8.6). Si toutefois on juge nécessaire de recalculer la ration alimentaire, on pèsera à nouveau les poissons au 14^e jour de l'essai (voir point 1.8.2.3). On pourra recourir à une autre méthode telle que la technique photographique par exemple pour évaluer les variations de taille des poissons à partir de quoi la ration alimentaire pourra être ajustée.

1.8.2. Conditions d'exposition**1.8.2.1. Durée**

La durée de l'essai est de ≥ 28 jours.

1.8.2.2. Taux de charge et densité de peuplement

Il importe que le taux de charge et la densité soient adaptés à l'espèce testée (voir appendice 1). Si la densité de peuplement est trop élevée, le stress engendré par la surpopulation entraînera une diminution des taux de croissance, et probablement la maladie. Si elle est trop faible, elle peut induire un comportement territorial susceptible d'affecter également la croissance. En tout état de cause, le taux de charge doit être suffisamment bas pour que la concentration de l'oxygène dissous puisse être maintenue à au moins 60 % de la valeur de saturation en air, sans aération. Un essai tournant (3) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, un taux de charge de 16 truites de 3 à 5 grammes dans un volume de 40 litres était acceptable. La fréquence de renouvellement de l'eau recommandée durant l'essai est de 6 litres/g de poissons par jour.

1.8.2.3. Alimentation

Les poissons doivent recevoir une alimentation adéquate (voir appendice 1) en quantité suffisante pour permettre un taux de croissance acceptable. Il faut veiller à éviter la prolifération microbienne et la turbidité de l'eau. Dans le cas de la truite arc-en-ciel, une ration quotidienne de 4 % de son poids corporel par jour devrait remplir ces conditions (3) (16) (17) (18). La ration quotidienne peut être divisée en deux parts égales et administrée aux poissons en deux fois, à au moins 5 heures d'intervalle. La ration est fonction du poids total initial des poissons dans chaque récipient d'essai. Si les poissons sont pesés à nouveau le 14^e jour, on recalcule la ration. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent leur pesée.

▼B

Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être enlevés quotidiennement des récipients d'essai par un nettoyage soigneux du fond de chaque récipient à l'aide d'un suceur.

1.8.2.4. *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendice 1).

1.8.3. Concentrations d'essai

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai, quelle que soit la conception de l'essai (voir point 1.7.2). Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (tirée par exemple d'un essai de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter le choix des concentrations d'essai adéquates. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la limite de solubilité de la substance dans l'eau.

Si un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation de la solution mère, sa concentration finale ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit, de préférence, être identique dans tous les récipients d'essai (voir point 1.6.3). Le recours à ce genre de produit devrait cependant être évité dans toute la mesure du possible.

1.8.4. Témoins

Le nombre de récipients témoins contenant l'eau de dilution dépend de la conception de l'essai (voir points 1.7-1.7.2). Si l'on utilise un agent solubilisant, on inclura le même nombre de témoins pour l'eau de dilution que pour l'agent solubilisant.

1.8.5. Fréquence des analyses quantitatives et des mesures

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers (voir ci-après).

Dans les essais dynamiques, les débits du diluant et de la solution mère de substance toxique seront vérifiés périodiquement, de préférence chaque jour. Ces débits ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Lorsque les concentrations de la substance d'essai sont censées ne pas s'écarter de ± 20 % des valeurs nominales (autrement dit rester comprises dans une plage de 80 à 120 %; voir points 1.6.2 et 1.6.3), on recommande d'analyser au moins la concentration la plus basse et la plus élevée au début de l'essai et périodiquement toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales (d'après les données sur la stabilité de la substance d'essai), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, mais selon le même régime.

Dans les essais semi-statiques (avec renouvellement) où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales, il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée juste après leur préparation et juste avant le renouvellement au début de l'essai et toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations selon le même régime que pour les substances plus stables.

▼B

On préconise de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles démontrent que la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue, tout au long de l'essai, dans un intervalle de $\pm 20\%$ autour de la concentration nominale ou de la concentration mesurée au départ, les résultats peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées.

Il peut s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à pores de $0,45\ \mu\text{m}$) ou de centrifuger les échantillons. La centrifugation est la procédure recommandée. Toutefois, si le milieu d'essai ne s'absorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale, l'alcalinité et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurées dans les récipients témoins et dans celui qui contient la concentration la plus forte. L'oxygène dissous et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, on recommande de mesurer l'oxygène dissous plus souvent, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Il faut mesurer le pH au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais à renouvellement statique et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. La dureté et l'alcalinité devraient être mesurées une fois au cours de chaque essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins un récipient d'essai.

1.8.6. Observations

Poids: à la fin de l'essai tous les poissons survivants seront pesés en poids frais (poissons essuyés, *blotted dry*) soit en groupes par récipient d'essai soit individuellement. Il est préférable de peser les animaux par récipient d'essai plutôt qu'individuellement, cette dernière méthode obligeant à marquer chaque poisson. Si l'on mesure le taux de croissance spécifique de chaque poisson (pesée individuelle), la technique de marquage devra être choisie de façon à perturber le moins possible les animaux [on peut utiliser une technique différente du cryo-marquage (par congélation), par exemple un mince fil de pêche coloré].

Il faut examiner quotidiennement les poissons durant l'essai et relever toutes les anomalies externes éventuelles (hémorragie, décoloration, par exemple) et les comportements anormaux. Les décès doivent être comptés et les poissons morts retirés du récipient dès que possible. Les poissons morts ne seront pas remplacés, le taux de charge et la densité de peuplement étant suffisamment élevés pour éviter que la modification du nombre de poissons ait des effets sur la croissance. Cependant, la ration alimentaire devra être ajustée.

2. RÉSULTATS ET RAPPORT

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, car cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai, de poissons etc. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, aucune orientation ou méthode statistique précise n'est proposée ici.

▼B

Il n'y a pas lieu de calculer les taux de croissance dans les récipients d'essai où la mortalité dépasse 10 %. Le taux de mortalité doit cependant être spécifié pour toutes les concentrations d'essai.

Quelle que soit la méthode utilisée pour analyser les données, le concept central est le taux de croissance spécifique r entre l'instant t_1 et l'instant t_2 . Il peut être défini de diverses manières selon que les poissons ont été ou non marqués individuellement ou selon que l'on recherche une moyenne par récipient.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

où:

r_1 = taux de croissance spécifique de chaque poisson

r_2 = taux de croissance spécifique moyen par récipient

r_3 = taux de croissance «pseudo»-spécifique

w_1, w_2 = poids d'un poisson donné aux instants t_1 et t_2 , respectivement

$\log_e w_1$ = logarithme du poids d'un poisson donné au début de la période d'étude

$\log_e w_2$ = logarithme du poids d'un poisson donné à la fin de la période d'étude

$\log_e W_1$ = moyenne des logarithmes des valeurs w_1 des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

$\log_e W_2$ = moyenne des logarithmes des valeurs w_2 des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

t_1, t_2 = moments (jours) du début et de la fin de la période d'étude

r_1, r_2, r_3 peuvent être calculés pour la période comprise entre le jour 0 et le jour 28 et, s'il y a lieu (c'est-à-dire lorsqu'une mesure a été effectuée au 14^e jour), pour les périodes entre 0 et 14 jours et 14 et 28 jours.

2.1.1. Analyse des résultats par régression (modélisation concentration-effet)

Cette méthode d'analyse établit une relation mathématique adéquate entre le taux de croissance spécifique et la concentration, ce qui permet d'estimer la «CE_X» c'est-à-dire toute valeur de CE requise. Si l'on utilise cette méthode, il est inutile de calculer r pour chaque poisson (r_1) et l'analyse peut alors s'appuyer sur la valeur moyenne de r pour le récipient (r_2). Cette dernière méthode est préférable. En outre, elle se prête mieux à l'utilisation d'espèces plus petites.

Pour étudier la relation concentration-effet, on porte sur un graphique les taux de croissance spécifiques moyens par récipient (r_2) en fonction de la concentration.

▼B

Pour exprimer la relation entre r_2 et la concentration, il convient de choisir un modèle adéquat et d'étayer ce choix par un raisonnement pertinent.

Si le nombre de poissons survivants varie suivant le récipient, le processus d'ajustement du modèle, qu'il soit simple ou non linéaire, doit être pondéré pour tenir compte de la taille inégale des groupes.

La méthode d'ajustement du modèle doit permettre d'estimer, par exemple, la CE_{20} et de déduire sa dispersion (écart-type ou intervalle de confiance). Le graphique du modèle ajusté devrait être montré en regard des données pour permettre d'apprécier l'adéquation de l'ajustement du modèle (9) (19) (20) (21).

2.1.2. Analyse des résultats pour l'estimation de la CME0

Si le test porte sur plusieurs récipients d'essai répliques (identiques) pour toutes les concentrations, l'estimation de la CME0 pourrait s'appuyer sur une analyse de la variance du taux de croissance spécifique moyen de chaque récipient (voir point 2.1), suivie de l'utilisation d'une méthode pertinente [par exemple, un test de Dunnett ou de Williams (13) (14) (15) (22)] consistant à comparer la moyenne r à chaque concentration avec la moyenne r des témoins afin d'identifier la concentration minimale à laquelle cette différence est significative avec un seuil de probabilité de 0,05. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne sont pas remplies — distribution non normale (par exemple, test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de mener l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse pondérée de la variance.

Si l'essai ne porte pas sur plusieurs récipients par concentration, l'analyse de la variance fondée sur les récipients sera insensible ou impossible. Dans ces circonstances, on peut parvenir à un compromis acceptable en fondant l'analyse de la variance sur le taux de croissance «pseudo» spécifique r_3 de chaque poisson.

La moyenne r_3 pour chaque concentration d'essai peut ensuite être comparée à la moyenne r_3 des témoins. Et la CME0 peut alors être déterminée comme précédemment. Il faut admettre que cette méthode ne tient absolument pas compte de la variabilité entre les récipients, en dehors de celle imputable à la variabilité entre les poissons, et n'offre aucune protection à cet égard. L'expérience a cependant montré (9) que la variabilité entre les récipients était très faible par rapport à celle qui existe dans les récipients (c'est-à-dire entre les poissons). Si l'analyse n'englobe pas les données concernant chaque poisson, il convient d'indiquer la méthode d'identification des valeurs aberrantes (erronées) et de justifier son emploi.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse ou, dans les essais semi-statiques, lorsque la concentration de la substance d'essai diminue entre le moment où la solution vient d'être préparée et le moment qui précède le renouvellement.

2.3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes:

▼B**2.3.1. Substance d'essai**

- État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,
- données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

2.3.2. Espèce testée

- Nom scientifique,
- souche éventuelle, taille, fournisseur, traitement préalable éventuel, etc.

2.3.3. Conditions d'essai

- Méthode utilisée (par exemple, semi-statique/avec renouvellement, dynamique, charge, densité de peuplement, etc.),
- conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai et de répliques, nombre de poissons par récipient),
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solubilisant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant),
- concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode de détermination et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie,
- caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, alcalinité, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore (si mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée,
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, dureté, température et concentration de l'oxygène dissous,
- informations détaillées sur l'alimentation, [par exemple, le type d'aliment(s), la source, la quantité donnée et la fréquence].

2.3.4. Résultats

- Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité relatifs à la survie, et données sur la mortalité à toutes les concentrations d'essai,
- techniques d'analyse statistique appliquées, statistiques fondées sur les répliques ou les poissons, traitement des données et justification des méthodes utilisées,
- tableaux donnant les poids individuels et moyens des poissons aux jours 0, 14 (si mesurés) et 28, valeurs des moyennes par récipient ou taux de croissance pseudo-spécifiques (s'il y a lieu) pour les périodes de 0 à 28 jours, ou éventuellement de 0 à 14 et de 14 à 28 jours,
- résultats de l'analyse statistique (analyse par régression ou analyse de la variance) fournis de préférence sous forme de tableau ou de graphique, CME0 ($p = 0,05$) et CSEO ou CE_X avec leurs écarts-types si possible,

▼B

— incidence de toute réaction inhabituelle des poissons et de tout effet visible produit par la substance d'essai.

3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, pp 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, pp 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 28, pp 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- (8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (10) Cox D.R. (1958). *Planning of experiments*. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp 482-491.

▼B

- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, pp 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* 120, 123-133.
- (16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- (18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- (20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the IC_p approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp 510-531.

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI ET CONDITIONS D'ESSAI APPROPRIÉES

| Espèce | Gamme de températures recommandée (°C) | Photopériode (heures) | Gamme recommandée pour le poids initial des poissons (g) | Précision requise de la mesure | Taux de charge (g/l) | Densité de peuplement (par litre) | Alimentation | Durée de l'essai (jours) |
|--|---|-----------------------|--|--------------------------------|----------------------|-----------------------------------|---|--------------------------|
| Espèce recommandée: <i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel | 12,5-16,0 | 12-16 | 1-5 | à 100 mg près | 1,2-2,0 | 4 | Spécialité alimentaire sèche pour frai de salmonidé | ≥ 28 |
| Autres espèces bien étudiées: <i>Danio rerio</i> Danio | 21-25 | 12-16 | 0,050-0,100 | à 1 mg près | 0,2-1,0 | 5-10 | nourriture vivante (<i>Brachionus Artemia</i>) | ≥ 28 |
| <i>Oryzias latipes</i> Medaka | 21-25 | 12-16 | 0,050-0,100 | à 1 mg près | 0,2-1,0 | 5-20 | nourriture vivante (<i>Brachionus Artemia</i>) | ≥ 28 |

▼B*Appendice 2***QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE
DILUTION ACCEPTABLE**

| Substance | Concentrations |
|---|----------------|
| Matières particulaires (particules) | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Pesticides organophosphorés totaux | < 50 ng/l |
| Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |



Appendice 3

Série logarithmique de concentrations convenant à un essai de toxicité (9)

| Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)(*) | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
| | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
| | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
| | | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
| | | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
| | | | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
| | | | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
| | | | | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
| | | | | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
| | | | | | 1,4 | 2,4 |
| | | | | | 1,0 | 1,8 |
| | | | | | | 1,3 |
| | | | | | | 1,0 |

(*) Une série de cinq concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10, adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

▼B**C.15. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ À COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN****1. MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité à court terme reprend la ligne directrice n° 212 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin consiste à exposer l'animal depuis le stade de l'œuf qui vient d'être fécondé jusqu'à la fin du stade de l'alevin. Aucune alimentation n'est fournie durant l'essai sur les embryons et les alevins, et l'essai devrait donc prendre fin alors que les alevins se nourrissent encore grâce à leur sac vitellin.

Cet essai vise à déterminer les effets létaux et, dans une moindre mesure, sublétaux de produits chimiques à des stades définis de la vie des espèces testées. Il devrait fournir des informations utiles en ce sens qu'il pourrait a) permettre de faire le lien entre les essais létaux et sublétaux, b) servir d'essai de sélection en vue soit d'un essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, soit d'un essai de toxicité chronique, et c) être utilisé pour tester des espèces pour lesquelles les techniques d'élevage ne sont pas suffisamment au point pour couvrir la période de transition entre alimentation endogène et alimentation exogène. Il faut savoir que seuls les essais couvrant tous les stades de la vie du poisson sont généralement susceptibles de donner une estimation précise de la toxicité chronique de produits chimiques pour les poissons et que toute limitation de l'exposition écartant tel ou tel stade de la vie risque de diminuer la sensibilité et donc de donner lieu à une sous-estimation de la toxicité chronique. L'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin devrait donc être moins sensible que l'essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, notamment en ce qui concerne les produits chimiques fortement lipophiles ($\log P_{oe} > 4$) et les substances possédant un mode d'action toxique particulier. On s'attend toutefois à ce que la différence de sensibilité entre les deux essais soit moindre pour les produits chimiques à mode d'action narcotique non spécifique (1).

Avant la publication du présent essai, l'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin a surtout été réalisé sur le poisson d'eau douce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (téléostéens, cyprinidés — nom commun: danio). C'est la raison pour laquelle l'appendice 1 donne des indications détaillées pour la réalisation de l'essai sur cette espèce. Cela n'exclut pas pour autant l'utilisation d'autres espèces de poissons pour lesquelles on dispose déjà d'une certaine expérience (tableaux A et B).

1.2. DÉFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'une substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p \leq 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO.

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Les poissons aux stades de l'embryon et de l'alevin sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dissoute dans l'eau. Le protocole permet de choisir entre un essai semi-statique ou dynamique. Le choix dépend de la nature de la substance d'essai. L'essai débute au moment où l'on place les œufs fécondés dans les enceintes expérimentales et prend fin juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale ait été complètement absorbé ou avant que des poissons témoins ne meurent d'inanition. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). Une autre possibilité consiste à analyser ces effets à l'aide d'un modèle de régression permettant d'estimer la concentration qui provoquerait un certain pourcentage d'effet (CL/CE_x) où x représente un pourcentage d'effet défini).

1.4. INFORMATIONS CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Ces résultats pourront s'avérer utiles pour sélectionner une plage de concentrations appropriée pour l'essai aux premiers stades de la vie. La solubilité dans l'eau (y compris la solubilité dans l'eau de l'essai) et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Pour déterminer la concentration de la substance dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.

Les informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oe}) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

- le taux global de survie des œufs fécondés dans les groupes témoins et, s'il y a lieu, dans les récipients ne contenant que le solvant, doit être supérieur ou égal aux limites définies dans les appendices 2 et 3,
- la concentration de l'oxygène dissous doit se situer entre 60 et 100 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai,
- à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de $\pm 1,5$ °C entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs, et devrait être maintenue dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (appendices 2 et 3).

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Enceintes d'essai**

N'importe quel récipient en verre ou fabriqué dans un matériau chimiquement inerte peut être utilisé. Les récipients doivent être suffisamment grands pour répondre aux critères de charge (voir point 1.7.1.2). Il est recommandé de placer les enceintes expérimentales au hasard dans la partie du laboratoire où se déroule l'essai. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma randomisé par blocs, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de les placer de façon complètement aléatoire, lorsqu'il existe des effets systématiques dans le laboratoire qui peuvent être contrecarrés par la randomisation par blocs. Si celle-ci est utilisée, elle doit être prise en compte dans l'analyse ultérieure des résultats. Les enceintes expérimentales doivent être protégées de toute perturbation indésirable.

1.6.2. **Sélection des espèces de poissons**

Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1A. Cela n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces (des exemples figurent dans le tableau 1B), mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Dans ce cas, les choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doivent être justifiés.

1.6.3. **Soin des poissons géniteurs**

La ligne directrice 210 de l'OCDE ⁽¹⁾ et les références (2) (3) (4) (5) (6) donnent des indications détaillées sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

1.6.4. **Manipulation des embryons et des larves**

Les embryons et les larves peuvent être exposés, au sein de la cuve principale, dans des récipients plus petits pourvus de côtés ou d'extrémités en filet, permettant le passage de la solution d'essai. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent dans ces petits récipients en les suspendant à un bras qui déplace le récipient verticalement, en gardant toujours les organismes submergés; un système de siphon peut aussi être employé. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion. Les pipettes Pasteur conviennent au prélèvement des embryons et des larves dans les essais semi-statiques où le milieu est entièrement renouvelé chaque jour (voir point 1.6.6).

Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve d'essai principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves ⁽¹⁾, mais il faut conserver des filets pour empêcher les poissons de s'échapper. Si les larves doivent être transférées, il ne faut pas les exposer à l'air ni utiliser de filets pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs (ces précautions sont superflues pour des espèces moins fragiles, comme la carpe). Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et il n'est pas toujours nécessaire. Dans les essais semi-statiques, des béciers ou des récipients peu profonds peuvent être utilisés, munis, si nécessaire, d'une grille placée un peu au-dessus du fond du récipient. Si le volume de ces récipients est suffisant pour satisfaire aux critères de charge (voir point 1.7.1.2), il n'est pas nécessaire de transférer les embryons ou les larves.

⁽¹⁾ OCDE. Paris, 1992, ligne directrice 210, «Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie».

▼B**1.6.5. Eau**

Toute eau répondant aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable (énumérées à l'appendice 4) et dans laquelle les témoins de l'espèce testée ont un taux de survie au moins aussi satisfaisant que celui décrit dans les appendices 2 et 3 peut être utilisée pour l'essai. La qualité de cette eau devrait rester constante pendant toute la durée de l'essai. La variation du pH devrait rester comprise dans un intervalle de $\pm 0,5$ unités. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai) ou ne nuira pas au comportement des poissons géniteurs, des échantillons doivent être prélevés périodiquement en vue d'être analysés. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (par exemple, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd et Ni), en principaux anions et cations (par exemple, Ca, Mg, Na, K, Cl et SO_4), en pesticides (par exemple, la totalité des organophosphorés et la totalité des organochlorés), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, lorsqu'on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante sur une période d'au moins un an, les déterminations pourront être plus espacées (par exemple, tous les six mois).

1.6.6. Solutions d'essai

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation mécanique de la substance d'essai dans l'eau de dilution (par exemple, au moyen d'un agitateur ou par ultrasons). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée. Le recours à des solvants ou dispersants (agents solubilisants) doit être évité dans toute la mesure du possible; il peut toutefois s'avérer nécessaire d'utiliser ces produits pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthyl-formamide et le triéthylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsque l'on utilise des agents facilement biodégradables (par exemple, l'acétone) et/ou volatils, car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. L'agent solubilisant, le cas échéant, ne doit pas exercer d'effet significatif sur la survie ni nuire de façon visible aux premiers stades de la vie. d'après l'observation d'un témoin ne comportant que le solvant. Cependant, l'usage de ces substances doit être évité dans toute la mesure du possible.

S'agissant des essais semi-statiques, deux méthodes de renouvellement peuvent être adoptées: soit i) les nouvelles solutions d'essai sont préparées dans des récipients propres et l'on transvase avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients avec un petit volume de solution ancienne, en évitant de les exposer à l'air, soit ii) les organismes testés sont laissés dans leur récipient d'essai pendant que l'on renouvelle au moins les trois-quarts de leur eau. La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si les tests préliminaires de stabilité (voir point 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (sort de l'intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudrait envisager de pratiquer un essai dynamique. Quoi qu'il en soit, il convient d'éviter de stresser les larves durant le renouvellement de l'eau.

▼B

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu la solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes expérimentales par 24 heures s'est avéré adéquat (2).

1.7. MODE OPÉRATOIRE

Des informations utiles concernant la marche à suivre pour les essais de toxicité sur les embryons de poisson et les alevins se trouvent dans les publications; la bibliographie de ce texte en donne quelques références (7) (8) (9).

1.7.1. Conditions d'exposition**1.7.1.1. Durée**

L'essai devrait débuter de préférence dans les 30 minutes qui suivent la fécondation des œufs. Les embryons sont immergés dans la solution d'essai avant, ou aussitôt que possible après, le commencement de la phase de segmentation du blastodisque et, dans tous les cas, avant le début du stade de la gastrula. Quand les œufs proviennent d'un fournisseur commercial, il n'est pas toujours possible de débuter l'essai juste après la fécondation. Comme la sensibilité de l'essai peut être fortement influencée par un retard dans son lancement, l'essai devrait débuter dans les 8 heures qui suivent la fécondation. Les larves n'étant pas nourries durant la période d'exposition, l'essai doit s'achever juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale soit complètement absorbé ou avant que les témoins ne meurent d'inanition. La durée de l'essai dépend de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées aux appendices 2 et 3.

1.7.1.2. Charge

Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Il y a lieu de les répartir au hasard entre les différents traitements et d'utiliser au moins 30 œufs fécondés répartis en nombre égal (ou aussi proche de l'égalité que possible, car il peut être difficile d'obtenir des lots identiques avec certaines espèces) entre au moins trois enceintes d'essai identiques pour chaque concentration. Le taux de charge (biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment bas pour qu'une concentration d'oxygène dissous d'au moins 60 % de la valeur de saturation en air puisse être maintenue sans aération. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution, à tout moment, a été recommandé (2).

1.7.1.3. Lumière et température

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendices 2 et 3). En vue de surveiller la température, il peut être approprié d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire.

▼B**1.7.2. Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3,2. La courbe de la CL₅₀ en fonction de la période d'exposition, obtenue au cours de l'étude de toxicité aiguë, doit être prise en considération lors de la sélection de la plage des concentrations d'essai. Il peut être judicieux, dans certaines circonstances, d'utiliser moins de cinq concentrations, par exemple, dans les essais limites, et un intervalle plus faible entre les concentrations. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à la CL₅₀ après 96 heures ou supérieures à 100 mg/l lorsque la CL₅₀ est supérieure à cette concentration. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans l'eau d'essai.

Lorsqu'un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir point 1.6.6), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

1.7.3. Témoins

Un témoin contenant l'eau de dilution (en autant d'exemplaires que de besoin) et, le cas échéant, un témoin contenant l'agent solubilisant (en autant d'exemplaires que de besoin) doivent être étudiés parallèlement aux séries traitées avec la substance.

1.7.4. Fréquence des analyses quantitatives et des mesures

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale (dans une plage de 80 à 120 %, voir points 1.4 et 1.6.6), il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée, dès leur préparation et juste avant le renouvellement du milieu, à au moins trois occasions régulièrement espacées au cours de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, dès leur préparation et au moment du renouvellement).

Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale (d'après les résultats concernant la stabilité de la substance), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations, dès leur préparation et au moment du renouvellement, mais selon le même régime, c'est-à-dire à au moins trois occasions, régulièrement espacées au cours de l'essai. La détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être réalisée que sur un seul récipient par concentration. Les déterminations ne devraient pas être espacées de plus de sept jours. On préconise de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles montrent que la concentration de la substance d'essai dans la solution s'est maintenue correctement dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale ou mesurée au départ, tout au long de l'essai, les résultats peuvent s'appuyer sur la concentration nominale ou les valeurs mesurées au départ.

Dans le cas des essais dynamiques, il convient d'appliquer un régime de prélèvement des échantillons similaire à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais le dosage des solutions juste avant leur renouvellement ne s'applique pas ici). Néanmoins, si l'essai dure plus de sept jours, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements au cours de la première semaine (par exemple, trois séries de mesures), afin de s'assurer que les concentrations d'essai restent stables.

▼B

Il peut, dans certains cas, s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à pores de 0,45 µm de diamètre) ou de centrifuger les échantillons. Toutefois, comme la centrifugation ou la filtration ne permettent pas toujours de séparer la fraction non biodisponible de la substance d'essai de sa fraction biodisponible, il peut être inutile de soumettre les échantillons à ces traitements.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale et la salinité, le cas échéant, doivent être déterminées dans les témoins et dans un des récipients contenant la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité, le cas échéant, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, il est recommandé de mesurer l'oxygène dissous plus fréquemment, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Le pH devrait être mesuré au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais semi-statiques et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. Il faudrait déterminer la dureté une fois dans chaque essai. La température devrait être mesurée quotidiennement et, de préférence, surveillée en continu dans au moins un récipient d'essai.

1.7.5. **Observations**

1.7.5.1. *Stade de développement embryonnaire*

Le stade embryonnaire (stade de la gastrula) au début de l'exposition à la substance d'essai doit être vérifié aussi précisément que possible. Cela peut se faire sur un échantillon représentatif d'œufs bien conservés et rendus translucides. Des descriptions et des illustrations des stades embryonnaires peuvent être consultées dans les publications (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Éclosion et survie*

Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Il peut être souhaitable d'effectuer des observations plus fréquentes au début de l'essai (par exemple, toutes les 30 minutes au cours des trois premières heures), puisque dans certains cas, les temps de survie peuvent être plus significatifs que le seul nombre de morts (notamment en cas d'effets toxiques aigus). Les larves et les embryons morts doivent être retirés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement. Il convient d'être extrêmement attentif, lorsque l'on retire les individus morts, à ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et les larves adjacents, qui sont très délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient en fonction du stade de développement:

- **pour les œufs:** en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque,
- **pour les embryons:** absence de mouvement corporel et/ou absence de battement du cœur et/ou décoloration opaque chez les espèces dont les embryons sont normalement transparents,
- **pour les larves:** immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction aux stimuli mécaniques.

▼B1.7.5.3. *Aspect anormal*

On doit noter le nombre de larves présentant une anomalie corporelle et/ou de la pigmentation, ainsi que le stade de résorption du sac vitellin, à des intervalles de temps adéquats, en fonction de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Il faut savoir que des larves et des embryons anormaux surviennent de façon naturelle et que leur proportion peut atteindre quelques pour cent chez le ou les témoins de certaines espèces. Les animaux anormaux ne doivent être retirés des récipients d'essai qu'à leur mort.

1.7.5.4. *Comportement anormal*

Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité atypique doivent être notées à des intervalles de temps qui dépendent de la durée de l'essai. Ces effets, bien que difficiles à quantifier, peuvent le cas échéant contribuer à l'interprétation des données de mortalité, en fournissant des informations sur le mode d'action toxique de la substance.

1.7.5.5. *Longueur*

À la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu en utilisant la longueur standard, la longueur à la fourche ou la longueur totale. Cependant, si l'on constate une putréfaction de la nageoire caudale ou une usure des nageoires, on doit employer la longueur standard. Habituellement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation de la longueur entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Poids*

À la fin de l'essai, chaque individu peut être pesé; le poids sec (24 heures à 60° C) est préférable au poids frais (poissons essuyés). Généralement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation du poids entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 %.

Ces observations permettront de livrer une partie ou la totalité des données suivantes à l'analyse statistique:

- mortalité cumulée,
- nombre de larves saines à la fin de l'essai,
- moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci (90 % d'œufs éclos dans chaque enceinte de concentration identique),
- nombre de larves écloses chaque jour,
- longueur (et poids) des animaux survivants à la fin de l'essai,
- nombre de larves déformées ou d'aspect anormal,
- nombre de larves présentant un comportement anormal.

▼B**2. RÉSULTATS ET RAPPORT****2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, puisque cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, le nombre de concentrations d'essai, le nombre initial d'œufs fécondés et les paramètres mesurés. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, on ne donnera pas ici d'orientations précises sur les méthodes statistiques.

Si la CMEO et la CSEO doivent être estimées, il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque série d'enceintes de concentration identique par l'analyse de la variance ou les méthodes avec tableau de contingence. La méthode de Dunnett peut être utile pour procéder à des comparaisons multiples entre les résultats obtenus à chaque concentration et ceux des témoins (12) (13). Il existe d'autres exemples pertinents (14) (15). La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance ou par d'autres méthodes (c'est-à-dire la puissance de l'essai) devrait être calculée et mentionnée dans le rapport. Il faut savoir que les observations énumérées au point 1.7.5.6 ne se prêtent pas toutes au traitement statistique par l'analyse de la variance. À titre d'exemple, la mortalité cumulée et le nombre de larves saines à la fin de l'essai pourraient être analysés à l'aide de méthodes des probits.

S'il y a lieu d'estimer la CL et la CE_X , une courbe adéquate, telle que la courbe logistique, doit être ajustée aux résultats étudiés par une méthode statistique telle que la méthode des moindres carrés ou des moindres carrés non linéaires. La ou les courbes doivent être paramétrées de façon que la CL et la CE, recherchées et leur écart-type puissent être estimés directement. Cela facilitera beaucoup le calcul des limites de confiance autour de la CL et de la CE_X . À moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, des limites de confiance de 95 % de part et d'autre devraient être choisies. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Des méthodes graphiques d'ajustement des courbes peuvent être utilisées. Toutes les observations énumérées au point 1.7.5.6 se prêtent à l'analyse de régression.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence, lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse. L'interprétation des résultats concernant les concentrations supérieures à la solubilité de la substance dans l'eau doit aussi se faire avec prudence.

2.3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.3.1. Substance d'essai

- État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,
- données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

▼B**2.3.2. Espèce d'expérience**

- Nom scientifique, variété, nombre de poissons parents (c'est-à-dire nombre de femelles utilisées pour fournir le nombre d'œufs requis par l'essai), source et méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

2.3.3. Conditions d'essai

- Méthode utilisée (par exemple, semi-statique ou dynamique, temps écoulé entre la fécondation et le début de l'essai, charge, etc.),
- photopériode(s),
- conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales et d'exemplaires de même concentration, nombre d'embryons par exemplaire),
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être spécifiés, le cas échéant),
- concentrations nominales de l'essai, valeurs mesurées dans les récipients d'essai, moyennes et écarts-types de celles-ci et méthode de détermination; si la substance d'essai est soluble dans l'eau à des concentrations inférieures à celles qui ont été testées, il faut démontrer que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai dans la phase dissoute,
- caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si elle a été mesurée), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si elle a été mesurée) et toute autre mesure effectuée,
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous.

2.3.4. Résultats

- Résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai,
- données montrant que les témoins répondent à la norme générale d'acceptabilité relative à la survie de l'espèce (appendices 2 et 3),
- résultats concernant la mortalité et la survie aux stades de l'embryon et de la larve et taux de mortalité et de survie globaux,
- délais d'éclosion et nombre d'œufs éclos,
- longueur (et poids),
- description et fréquence des anomalies morphologiques, le cas échéant,
- description et fréquence des effets sur le comportement, le cas échéant,
- analyse statistique et traitement des données,
- pour les essais soumis à l'analyse de la variance, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) à $p = 0,05$ et la concentration sans effet observé (CSEO) pour chaque réponse évaluée, ainsi qu'une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui peut être détecté.

▼B

- pour les essais analysés à l'aide de techniques de régression, la CL et la CE_x et leurs intervalles de confiance et un graphique du modèle ajusté utilisé pour les calculer,
- justification de tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FEES Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.
- (6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry. 6, pp. 61-71.
- (8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.
- (9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.
- (10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.
- (14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

- (15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, pp. 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.
- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, pp. 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London, Series B*, 252: pp. 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, pp. 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, pp. 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E. K. (1985). *Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives*, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., *Fish Physiology*, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Tableau 1A

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

 Eau douce

Oncorhynchus mykiss
 Truite arc-en-ciel (9) (16)

Danio rerio
 Danio (7) (17) (18)

Cyprinus caprio
 Carpe commune (8) (19)

Oryzias latipes
 Medaka (20) (21)

Pimephales promelas
 Tête-de-boule (8) (22)

▼B

Tableau 1B

Exemples d'autres espèces également utilisées et sur lesquelles on possède une bonne documentation

| Eau douce | Eau salée |
|----------------------------|--|
| <i>Carassius auratus</i> | <i>Menidia peninsulae</i> |
| Cyprin doré (8) | Capucette nord-américaine (23) (24) (25) |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | <i>Clupea harengus</i> |
| Crapet arlequin (8) | Hareng (24) (25) |
| | <i>Gadus morhua</i> |
| | Morue (24) (25) |
| | <i>Cyprinodon variegatus</i> |
| | Fondule tête de mouton (23) (24) (25) |

▼B*Annexe I***ORIENTATIONS POUR LA RÉALISATION D'UN ESSAI DE TOXICITÉ
SUR LES EMBRYONS ET LES ALEVINS DU DANIO (*BRACHYDANIO
RERIO*)**

INTRODUCTION

Le danio est originaire de la côte de Coromandel, en Inde, où il peuple les rivières à courant rapide. C'est une espèce courante en aquarium, appartenant à la famille des carpes. Des informations sur les méthodes d'élevage et les soins à lui apporter se trouvent dans des manuels de référence sur les poissons tropicaux. Sa biologie et son utilisation dans la recherche liée à la pêche ont été passées en revue par Laale (1).

Ce poisson dépasse rarement 45 mm de longueur. Son corps cylindrique arbore 7 à 9 rayures horizontales bleu foncé et argentées. Ces rayures se prolongent dans les nageoires caudales et anales. Son dos est vert olive. Les mâles sont plus minces que les femelles. Les femelles sont plus argentées et leur abdomen est distendu, en particulier avant le frai.

Les poissons adultes sont capables de supporter de grandes fluctuations de température, de pH et de dureté. Toutefois, afin de disposer de poissons sains qui produisent des œufs de bonne qualité, il faut leur fournir des conditions optimales.

Pendant la parade nuptiale, le mâle poursuit la femelle et lui donne des coups de tête; les œufs sont fécondés dès qu'ils sont expulsés. Les œufs, qui sont transparents et non adhérents, tombent au fond où ils peuvent être mangés par les parents. Le frai est influencé par la lumière. Si la lumière du matin est suffisante, le poisson fraie habituellement au cours des premières heures qui suivent le lever du soleil.

Une femelle peut produire des pontes de plusieurs centaines d'œufs à des intervalles d'une semaine.

ÉTAT DES POISSONS PARENTS, REPRODUCTION ET PREMIERS STADES DE LA VIE

Un nombre adéquat de poissons sains est sélectionné et gardé dans une eau appropriée (voir à l'appendice 4 par exemple) pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Le groupe de poissons devrait s'être reproduit au moins une fois avant d'engendrer la série d'œufs utilisés dans l'essai. La densité des poissons durant cette période ne devrait pas excéder 1 gramme de poissons par litre. La densité pourra être plus élevée si l'eau est renouvelée régulièrement ou si on a recours à des systèmes de purification. La température des aquariums devrait être maintenue à 25 ± 2 °C. Les poissons devraient recevoir un régime alimentaire varié, qui pourrait se composer, par exemple, d'aliments déshydratés appropriés trouvés dans le commerce, d'*Artemia* vivants récemment éclos, de chironomidés, de *Daphnia* et de vers blancs de la famille des enchytréidés.

Deux méthodes ayant permis d'obtenir un lot suffisant d'œufs fécondés sains, en vue de l'essai, sont résumées ci-dessous:

- i) Huit femelles et seize mâles sont placés dans un aquarium contenant 50 litres d'eau de dilution, protégé de la lumière directe. On évitera le plus possible de les perturber pendant au moins 48 heures. Un support de frai est disposé au fond de l'aquarium, pendant l'après-midi du jour qui précède le début de l'essai. Le support de frai se compose d'un cadre (en plexiglas ou dans un autre matériau adapté) de 5 à 7 cm de haut, muni d'un filet à grosse maille (2-5 mm) à son sommet et d'un filet à mailles fines (10-30 µm) à sa base. Plusieurs «arbres à frai», consistant en une corde de nylon non torsadée, sont attachés au filet à grosses mailles du support. Après que les poissons ont été laissés dans l'obscurité pendant 1 à 2 heures, on allume une faible lumière qui va déclencher le frai. 2 à 4 heures après le frai, le support de frai est retiré et les œufs sont récupérés. Le support de frai empêchera les poissons de manger les œufs et facilitera en même temps la collecte des œufs. Le groupe de poissons devra avoir frayé au moins une fois avant le frai qui donnera les œufs destinés à l'essai.

▼B

- ii) Cinq à dix poissons mâles et femelles sont gardés dans des aquariums individuels pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Après 5 à 10 jours, les abdomens des femelles seront distendus et leurs papilles génitales appaîtront visiblement. Les poissons mâles n'ont pas de papilles. Le frai se déroule dans des cuves équipées d'un fat fond en filet (voir ci-dessus). La cuve est remplie d'eau de dilution jusqu'à une hauteur de 5 à 10 cm au-dessus du filet. Une femelle et deux mâles sont placés dans la cuve un jour avant le frai prévu. La température de l'eau (portée progressivement à un degré au-dessus de la température d'acclimatation). On éteint la lumière et on évite autant que possible toute perturbation aux poissons. Au matin, une faible lumière est allumée, qui déclenchera le frai. Après 2 à 4 heures, les poissons sont enlevés et les œufs récoltés. Si le nombre d'œufs nécessaire dépasse la capacité de production d'une femelle, un nombre suffisant de cuves de frai peut être disposé en parallèle. En outre, la capacité de reproduction de chaque femelle avant l'essai (taille de la ponte et qualité des œufs), on peut sélectionner les femelles qui possèdent la capacité de reproduction la plus avantageuse pour l'essai.

Les œufs doivent être transférés vers les récipients d'essai dans des tubes en verre (diamètre intérieur supérieur ou égal à 4 mm) dotés d'une poire aspirante souple. La quantité d'eau accompagnant les œufs lors de leur transfert devrait être aussi faible que possible. Les œufs sont plus denses que l'eau et tombent hors du tube. Il faut veiller à ce que les œufs (et les larves) n'entrent pas en contact avec l'air. On procédera à un examen microscopique d'un ou de plusieurs échantillons de pontes, pour vérifier s'il n'y a pas d'anomalies aux premiers stades de développement. La désinfection des œufs n'est pas autorisée.

Le taux de mortalité des œufs est le plus élevé dans les 24 heures qui suivent la fécondation. On observe souvent une mortalité de 5 à 40 % durant cette période. Les œufs dégénèrent parce que la fécondation a échoué ou le développement ne se déroule pas normalement. La qualité des œufs d'une ponte semble dépendre de la femelle, certaines femelles produisant systématiquement des œufs de bonne qualité, tandis que d'autres n'y arrivent jamais. La vitesse de développement et d'éclosion varie aussi d'une ponte à l'autre. Les œufs dont la fécondation s'est bien déroulée et les alevins présentent un taux de survie élevé, normalement supérieur à 90 % pour cent. À 25 °C, les œufs éclosent 3 à 5 jours après la fécondation et le sac vitellin est absorbé environ 13 jours après la fécondation.

Le développement embryonnaire a été bien caractérisé par Hisaoka et Battle (2). Grâce à la transparence des œufs et des larves écloses, il est possible de suivre le développement des poissons et d'observer la présence de malformations. Environ 4 heures après le frai, les œufs fécondés peuvent être distingués des œufs non fécondés (3). Les œufs et les larves sont placés dans des récipients d'essai de petit volume puis examinés au microscope.

Les conditions d'essai qui s'appliquent aux premiers stades de la vie sont énumérées à l'appendice 2. Les valeurs optimales pour le pH et la dureté de l'eau de dilution sont respectivement de 7,8 et de 250 mg de CaCO₃/l.

CALCULS ET STATISTIQUES

Une démarche en deux étapes est proposée. Tout d'abord, on procède à l'analyse statistique des données concernant la mortalité, les anomalies du développement et le moment de l'éclosion. Ensuite, on évalue statistiquement la longueur corporelle des poissons pour les concentrations auxquelles aucun effet nuisible n'a été détecté sur l'ensemble de ces trois premiers paramètres. Cette démarche est souhaitable étant donné que le produit toxique peut sélectivement tuer les plus petits poissons, retarder l'éclosion et induire des malformations évidentes, et par conséquent fausser les mesures de la longueur. En outre, il y aura à peu près le même nombre de poissons à mesurer par traitement, ce qui garantira la validité de l'analyse statistique de l'essai.

▼BDÉTERMINATION DE LA CL₅₀ ET DE LA CE₅₀

Le pourcentage d'œufs et de larves survivants est calculé et corrigé en fonction de la mortalité chez les témoins à l'aide de la formule d'Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100 \right)$$

où:

P = pourcentage de survivants corrigé

P' = pourcentage de survivants observé dans la concentration d'essai

C = pourcentage de survivants chez les témoins

Si possible, la CL₅₀ devra être déterminée par une méthode appropriée à la fin de l'essai.

Si l'on souhaite intégrer les données relatives aux malformations morphologiques dans le traitement statistique de In CE₅₀ on trouvera des indications à ce sujet dans l'article de Stephan (5).

ESTIMATION DE LA CME0 ET DE LA CSEO

L'essai de toxicité aux stades de l'embryon et de l'alevin vise notamment à comparer les expériences menées à des concentrations non nulles avec les témoins afin de déterminer la CME0. Il y a donc lieu d'appliquer les méthodes de comparaisons multiples (6) (7) (8) (9) (10).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10. pp. 121-173.
- (2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102. 311 pp.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.
- (4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.
- (5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.
- (6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.
- (7) Dunnett C. W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.
- (8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.
- (9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.
- (10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

| Espèce | Température (degrés C) | Salinité (%) | Photopériode (heures) | Durée des stades (jours) | | Durée habituelle de l'essai | Survie des témoins (% minimum) | |
|--|--|-----------------|--------------------------|-----------------------------|--------|---|-----------------------------------|----------------|
| | | | | Embryon | Alevin | | Taux de réussite de l'éclosion | Après éclosion |
| EAU DOUCE | | | | | | | | |
| <i>Brachydanio rerio</i> Danio | 25 ± 1 | — | 12-16 | 3-5 | 8-10 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (8-10 jours) | 80 | 90 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel | 10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾ | — | 0 ⁽³⁾ | 30-35 | 25-30 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 20 jours après l'éclosion (50-55 jours) | 66 | 70 |
| <i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune | 21-25 | — | 12-16 | 5 | > 4 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours) | 80 | 75 |
| <i>Oryzias latipes</i> Medaka | 24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾ | — | 12-16 | 8-11 | 4-8 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (13-16 jours) | 80 | 80 |
| <i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule | 25 ± 2 | — | 16 | 4-5 | 5 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours) | 60 | 70 |

⁽¹⁾ Pour les embryons.

⁽²⁾ Pour les larves.

⁽³⁾ Obscurité pour les embryons et les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion, sauf pendant qu'on les examine. Une lumière tamisée est ensuite appliquée jusqu'à la fin de l'essai.

Conditions de l'essai, durée et critères de survie pour d'autres espèces sur lesquelles on possède une bonne documentation

| Espèce | Température (degrés C) | Salinité (% 0) | Photopériode (heures) | Durée des stades (jours) | | Durée habituelle de l'essai sur l'embryon et l'alevin | Survie des témoins (% minimum) | |
|--|------------------------|----------------|-----------------------|--------------------------|--------|--|---------------------------------|----------------|
| | | | | Embryon | Alevin | | Taux de réussite de l'éclosion | Après éclosion |
| EAU DOUCE | | | | | | | | |
| <i>Carassius auratus</i> Cyprin doré | 24 ± 1 | — | — | 3-4 | > 4 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours) | — | 80 |
| <i>Léopomis macrochirus</i> Crapet arlequin | 21 ± 1 | — | 16 | 3 | > 4 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours) | — | 75 |
| EAU SALÉE | | | | | | | | |
| <i>Menidia peninsulae</i> Capucette nord-américaine | 22-25 | 15-22 | 12 | 1,5 | 10 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (6-7 jours) | 80 | 60 |
| <i>Clupea harengus</i> Hareng | 10 ± 1 | 8-15 | 12 | 20-25 | 3-5 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (23-27 jours) | 60 | 80 |
| <i>Gadus morhua</i> Morue | 5 ± 1 | 5-30 | 12 | 14-16 | 3-5 | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (18 jours) | 60 | 80 |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton | 25 ± 1 | 15-30 | 12 | — | — | Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4/7 jours après l'éclosion (28 jours) | > 75 | 80 |

▼B*APPENDICE 4***QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE
DILUTION ACCEPTABLE**

| Substance | Concentrations |
|---|----------------|
| Matières particulaires | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Pesticides organophosphorés totaux | < 50 ng/l |
| Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |

▼B**C.16. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË
PAR VOIE ORALE****1. MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice n° 213 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par voie orale des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par voie orale pour les abeilles domestiques, par exemple, lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par voie orale vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante: essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité aiguë par voie orale: effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'administration d'une dose unique de la substance d'essai par voie orale.

Dose: de substance d'essai consommée. La dose est exprimée en masse (μg) de substance d'essai par animal testé ($\mu\text{g}/\text{abeille}$). La dose réellement consommée par chaque abeille ne peut être calculée, étant donné que les abeilles sont nourries collectivement, mais il est possible d'estimer une dose moyenne (quantité totale de substance d'essai consommée/nombre d'abeilles testées par cage).

DL₅₀ (dose létale 50 %) orale: dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La DL₅₀ s'exprime en μg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes (*Apis mellifera*) sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dispersée dans une solution de saccharose. Elles reçoivent ensuite la même alimentation, mais sans la substance d'essai. La mortalité est notée quotidiennement durant au moins 48 heures et comparée aux valeurs des témoins. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, tandis que la mortalité des témoins demeure à un niveau acceptable, c'est-à-dire $\leq 10\%$, il convient d'allonger la durée de l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. On analyse les résultats afin de calculer la DL₅₀ à 24 heures et à 48 heures et, si l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

▼B

1.4. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

- le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,
- la DL₅₀ de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Collecte des abeilles**

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans une étuve et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc., ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant 4 semaines à partir de la fin du dernier traitement.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à une température de 25 ± 2 °C. L'humidité relative, comprise normalement entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations, et notamment le traitement et les observations, peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). Les abeilles sont nourries avec une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume). Après que les doses d'essai ont été administrées, l'alimentation doit être fournie ad libitum. Le système d'alimentation doit permettre l'enregistrement de la prise de nourriture dans chaque cage (voir point 1.6.3.1). Un tube de verre (de quelque 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm) peut être utilisé.

1.5.3. **Préparation des abeilles**

Les abeilles récoltées sont réparties au hasard dans les cages d'essai qui, elles-mêmes, sont disposées au hasard dans la salle d'expérience.

▼B

Les abeilles peuvent être privées de nourriture pendant une durée maximale de 2 heures avant le début de l'essai. On recommande de faire jeûner les abeilles avant le traitement pour que le niveau de remplissage de leur tube digestif soit identique au début de l'essai. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

1.5.4. Préparation des doses

Si la substance d'essai est miscible dans l'eau, elle peut être dispersée directement dans une solution de saccharose à 50 %. Pour les produits de qualité technique et les substances peu solubles dans l'eau, des véhicules tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple, de l'acétone, du diméthylformamide, du diméthylsulfoxyde). La concentration du véhicule dépend de la solubilité de la substance d'essai et doit être identique pour toutes les concentrations testées. Cependant, il convient généralement d'appliquer une concentration de 1 % pour le véhicule et de ne pas la dépasser.

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées; autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés: une solution aqueuse et une solution de saccharose renfermant le solvant ou le véhicule à la même concentration que dans les solutions d'essai.

1.6. MODE OPÉRATOIRE**1.6.1. Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testés par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50} , avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement 5 doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50} . Toutefois, le facteur de dilution et le nombre de concentrations du traitement doivent être déterminés en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les concentrations appropriées pour le dosage.

Il faut tester au moins 3 groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai. Pas moins de 3 groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Des séries de témoins devraient également être incluses pour les solvants ou les véhicules utilisés (voir point 1.5.4).

1.6.2. Étalon de toxicité

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins 3 doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50} . Chaque dose doit être testée dans au moins 3 cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par voie orale après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,35 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose/effet escomptée (par exemple le parathion).

▼B**1.6.3. Exposition****1.6.3.1. Administration des doses**

Il faut fournir à chaque groupe d'abeilles testé 100 à 200 µl d'une solution aqueuse de saccharose à 50 % contenant la substance d'essai à la concentration appropriée. Il est nécessaire d'administrer un volume plus grand dans le cas des produits peu solubles, peu toxiques ou peu concentrés dans la préparation, étant donné qu'il faut utiliser des proportions plus élevées dans la solution de saccharose. La quantité de nourriture traitée consommée par groupe doit être surveillée. Une fois vidé (généralement en 3 à 4 heures), le tube contenant la solution alimentaire traitée doit être retiré de la cage et remplacé par un tube contenant une solution de saccharose pure. Les solutions de saccharose sont ensuite fournies ad libitum. Pour certains composés, la nourriture traitée avec des concentrations élevées peut être rejetée par les abeilles, si bien que la quantité de nourriture consommée risque d'être faible ou nulle. Après 6 heures au maximum, la nourriture traitée non consommée doit être remplacée par une solution de saccharose pure. La quantité de nourriture traitée consommée doit être évaluée (par exemple, en mesurant le volume ou le poids de la nourriture traitée restante).

1.6.3.2. Durée

L'essai dure 48 heures après que la solution d'essai a été remplacée par une solution de saccharose pure. Si la mortalité continue de s'accroître de plus de 10 % après les premières 24 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins n'excède pas 10 %.

1.6.4. Observations

La mortalité est relevée 4 heures après le début de l'essai et ensuite 24 heures et 48 heures après que la dose a été administrée. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

La quantité de solution alimentaire consommée par groupe doit être estimée. La comparaison entre les taux de consommation des solutions traitées et non traitées en l'espace de 6 heures peut donner une idée des qualités organoleptiques de la nourriture traitée.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

1.6.5. Essai limite

Dans certains cas (par exemple, lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté avec 100 µg de substance active/abeille afin de démontrer que la DL₅₀ est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les 3 groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires, l'évaluation de la quantité de nourriture traitée consommée et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir point 1.6.4), il faut les noter.

▼B**2. RÉSULTATS ET RAPPORT****2.1. RÉSULTATS**

Les résultats doivent être récapitulés sous la forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose/effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 heures, 48 heures, et, si nécessaire, 72 heures, 96 heures) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50 % (DL₅₀) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). Lorsque la nourriture traitée n'est pas complètement consommée, la dose de la substance d'essai consommée par groupe doit être déterminée. La DL₅₀ doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. Substance d'essai

- État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur),
- données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

2.2.2. Espèce d'expérience

- Nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte,
- informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

2.2.3. Conditions d'essai

- Température et humidité relative de la salle d'expérience,
- conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages,
- méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai (le solvant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant),
- conception de l'essai, par exemple, nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin: nombre de cages et nombre d'abeilles par cage,
- date de l'essai.

▼B2.2.4. **Résultats**

- Résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant,
- données brutes: mortalité à chaque dose testée et à chaque temps d'observation.
- courbes dose/effet à la fin de l'essai,
- valeurs de la DL_{50} avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité,
- méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL_{50} ,
- mortalité chez les témoins,
- autres effets biologiques observés ou mesurés, par exemple, comportement anormal des abeilles (y compris rejet de la dose d'essai), vitesse de consommation de la nourriture dans les groupes traités et non traités,
- tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B**C.17. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT****1. MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice n° 214 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par contact des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par contact pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par contact vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante: essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité aiguë par contact: effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'application locale d'une dose unique de la substance d'essai.

Dose: quantité de substance d'essai appliquée. La dose est exprimée en masse (μg) de substance d'essai par animal testé ($\mu\text{g}/\text{abeille}$).

DL₅₀ (dose létale 50 %) par contact: dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par contact. La DL₅₀ est exprimée en μg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dissoute dans un véhicule approprié, par application directe sur le thorax (aérosol). L'essai dure 48 heures. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, alors que la mortalité des témoins reste à un niveau acceptable, c'est-à-dire $\leq 10\%$, il convient de prolonger l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. La mortalité est notée tous les jours et comparée avec les valeurs des témoins. On analyse les résultats afin de calculer la DL₅₀ à 24 heures et à 48 heures et, au cas où l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

▼B1.4. **VALIDITÉ DE L'ESSAI**

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

- le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,
- la DL₅₀ de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

1.5. **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**1.5.1. **Collecte des abeilles**

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans un incubateur et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antiviroles, etc., ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant 4 semaines à partir de la fin du dernier traitement.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à 25 ± 2 °C. L'humidité relative, généralement comprise entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations, et notamment le traitement et les observations, peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). La nourriture se compose d'une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume), fournie ad libitum durant toute la durée de l'essai à l'aide d'une mangeoire pour abeilles. Celle-ci peut consister en un tube de verre (d'environ 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm).

1.5.3. **Préparation des abeilles**

Les abeilles récoltées peuvent être anesthésiées avec du dioxyde de carbone ou de l'azote en vue de l'application de la substance d'essai. La quantité d'anesthésiant utilisée et la durée de l'exposition doivent être réduites au minimum. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

1.5.4. **Préparation des doses**

La substance d'essai doit être appliquée sous la forme de solution dans un véhicule, à savoir un solvant organique ou de l'eau avec un agent mouillant. Parmi les solvants organiques, on préfère l'acétone, mais d'autres solvants organiques peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde). Dans le cas des préparations chimiques dispersées dans l'eau et des substances organiques fortement polaires non solubles dans les solvants organiques, les solutions peuvent être plus faciles à appliquer si elles sont préparées dans une solution faible d'un agent mouillant commercial (par exemple, Agral, Citowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées, autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés, l'un étant traité avec de l'eau et l'autre avec le solvant ou le dispersant.

1.6. MODE OPÉRATOIRE**1.6.1. Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testes par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50} , avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement cinq doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50} . Toutefois, le nombre de doses doit être déterminé en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les doses appropriées.

Il faut tester au moins 3 groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai.

Pas moins de 3 groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testes parallèlement aux groupes traités. Si on utilise un solvant organique ou un agent mouillant, 3 groupes supplémentaires de 10 abeilles chacun doivent être inclus pour le solvant ou l'agent mouillant.

1.6.2. Étalon de toxicité

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins 3 doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50} . Chaque dose doit être testée dans au moins 3 cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par contact après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,30 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose/effet escomptée (par exemple, le parathion).

1.6.3. Exposition**1.6.3.1. Administration des doses**

Les abeilles anesthésiées sont traitées individuellement par application locale. Les abeilles sont réparties au hasard entre les groupes traités aux différentes doses et les groupes témoins. Un volume de 1 µl de solution contenant la substance d'essai à la concentration appropriée doit être appliqué à l'aide d'un micro-applicateur sur la face dorsale du thorax de chaque abeille. D'autres volumes peuvent être utilisés si cela se justifie. Après l'application, les abeilles sont réparties entre les cages d'essai dans lesquelles on distribue une solution de saccharose.

1.6.3.2. Durée

L'essai dure 48 heures. Si la mortalité augmente de plus de 10 % entre 24 heures et 48 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

▼B**1.6.4. Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après l'application de la dose, puis 24 heures et 48 heures après celle-ci. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures pendant 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

1.6.5. Essai limite

Dans certains cas (par exemple lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté avec 100 µg de substance active/abeille afin de démontrer que la DL₅₀ est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les 3 groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir point 1.6.4), il faut les noter.

2. RÉSULTATS ET RAPPORT**2.1. RÉSULTATS**

Les résultats doivent être récapitulés sous la forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai, ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 heures, 48 heures, et, si nécessaire, 72 heures, 96 heures) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50 % (DL₅₀) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). La DL₅₀ doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. Substance d'essai

- État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur),
- données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

2.2.2. Espèce d'expérience

- Nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte,
- informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

▼B**2.2.3. Conditions d'essai**

- Température et humidité relative de la salle d'expérience,
- conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages,
- modalités d'administration de la substance d'essai, par exemple, solvant utilisé, volume de solution d'essai appliqué, anesthésiants utilisés,
- conception de l'essai, par exemple, nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin: nombre de cages et nombre d'abeilles par cage,
- date de l'essai.

2.2.4. Résultats

- Résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant,
- données brutes: mortalité à chaque concentration testée et à chaque temps d'observation,
- courbes dose/effet à la fin de l'essai,
- valeurs de la DL₅₀ avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité,
- méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL₅₀,
- mortalité chez les témoins,
- autres effets biologiques observés et toute réaction anormale des abeilles,
- tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.
- (2) Cough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B**C.18. DÉTERMINATION DE L'ADSORPTION/DÉSORPTION AU MOYEN DE LA MÉTHODE PAR AGITATION****1. MÉTHODE**

La méthode décrite reprend la ligne directrice n° 106 de l'OCDE sur l'adsorption/désorption dans les sols fondée sur la méthode par agitation (2000).

1.1. INTRODUCTION

La méthode s'inspire d'un test circulaire, d'un séminaire sur la sélection des sols pour le développement d'un essai d'adsorption (1) (2) (3) (4) et de certaines lignes directrices nationales (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Les études d'adsorption/désorption donnent des informations précieuses sur la mobilité des substances chimiques et leur répartition dans les trois compartiments de la biosphère (lithosphère, hydrosphère, atmosphère) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Ces informations servent à prédire et à évaluer certaines caractéristiques d'une substance: la capacité de dégradation (22) (23), de transformation et d'absorption par les organismes (24), la lixiviation à travers le sol (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), la volatilité à partir du sol (21) (29) (30), le ruissellement à la surface du sol vers les eaux naturelles (18) (31) (32). Les données sur l'adsorption peuvent être utilisées à des fins de comparaison ou de modélisation (19) (33) (34) (35).

La distribution d'une substance chimique entre les phases solides et aqueuses est un processus complexe qui dépend d'un grand nombre de facteurs: nature chimique de la substance (12) (36) (37) (38) (39) (40), caractéristiques du sol (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), mais aussi des conditions climatiques, telles que précipitations, température, ensoleillement, vent. La méthode présentée ici, qui est un modèle de laboratoire simplifié, ne permet pas d'expliquer entièrement les phénomènes et les mécanismes impliqués dans l'adsorption d'une substance chimique par le sol. Mais si elle n'est pas exhaustive, elle donne tout de même d'utiles informations sur les effets environnementaux de l'adsorption d'un produit chimique.

Voir également l'introduction générale.

1.2. OBJET DE LA MÉTHODE

La méthode vise à évaluer le comportement d'adsorption/désorption d'une substance dans les sols. Il s'agit d'obtenir une valeur de sorption permettant de prédire le partage d'une substance sous diverses conditions environnementales. Les coefficients d'adsorption à l'équilibre d'une substance chimique sur différents sols sont déterminés en fonction des caractéristiques du sol (par exemple, teneur en carbone organique, teneur en argile, texture, pH). Il faut utiliser plusieurs types de sols pour couvrir le plus grand nombre possible d'interactions d'une substance donnée avec des sols naturels.

La présente méthode considère l'adsorption comme la liaison d'une substance chimique à la surface des sols. Elle ne fait pas de distinction entre les différents processus d'adsorption (adsorption physique et chimique) et d'autres processus tels que la dégradation catalysée par la surface, l'adsorption de masse ou la réaction chimique. Elle ne tient pas compte de l'adsorption sur les particules colloïdales (diamètre < 0,2 µm) générées par les sols.

▼B

Les paramètres considérés comme les plus importants pour l'adsorption sont: la teneur en carbone organique (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), la teneur en argile, la texture (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), le pH (pour les composés ionisables) (3) (4) (42). D'autres sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'adsorption: la capacité d'échange cationique réelle (CECR), la teneur en fer amorphe et en oxydes d'aluminium, notamment dans le cas des sols volcaniques et tropicaux (4), ainsi que la surface spécifique (49).

L'essai permet d'évaluer l'adsorption d'une substance chimique sur des sols de texture et de pH différents et n'ayant pas la même teneur en carbone organique et en argile. Il comprend trois phases:

Phase 1: Étude préliminaire servant à déterminer:

- le rapport sol/solution,
- le temps d'équilibre de l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre,
- l'adsorption de la substance sur la surface des récipients d'essai et la stabilité de la substance durant l'essai.

Phase 2: Essai de sélection: l'adsorption est étudiée sur cinq sols différents. On détermine la cinétique d'adsorption avec une concentration unique ainsi que le coefficient de distribution K_d et K_{oc} .

Phase 3: Détermination des isothermes d'adsorption de Freundlich: cet essai sert à évaluer l'effet de la concentration sur le degré d'adsorption sur les sols.

Étude de la désorption par l'évaluation de la cinétique et des isothermes de désorption de Freundlich (appendice 1).

1.3. DÉFINITIONS ET UNITÉS

| Symbole | Définition | Unités |
|-------------------------|--|---------------|
| A_{t_i} | pourcentage d'adsorption au temps t_i | % |
| A_{eq} | pourcentage d'adsorption à l'équilibre | % |
| $m_s^{ads}(t_i)$ | masse de substance adsorbée sur le sol à l'instant t_i | μg |
| $m_s^{ads}(\Delta t_i)$ | masse de substance adsorbée sur le sol durant l'intervalle de temps Δt_i | μg |
| $m_s^{ads}(eq)$ | masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption | μg |
| m_0 | masse de substance dans le tube au début de l'essai | μg |
| $m_m^{ads}(t_i)$ | masse de substance mesurée dans une aliquote (v_a^A) au temps t_i | μg |
| $m_{aq}^{ads}(eq)$ | masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption | μg |
| m_{soil} | quantité de phase de sol exprimée en masse sèche du sol | g |

▼B

| Symbole | Définition | Unités |
|-------------------------|--|---|
| C_{st} | concentration massique de la solution de réserve | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |
| C_0 | concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |
| $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps t_i , lorsque l'analyse est effectuée | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |
| $C_s^{ads}(eq)$ | concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption | $\mu\text{g g}^{-1}$ |
| $C_{aq}^{ads}(eq)$ | concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |
| V_0 | volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai d'adsorption | cm^3 |
| v_a^A | volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée | cm^3 |
| K_d | coefficient de répartition de l'adsorption | $\text{cm}^{-3} \text{g}^{-1}$ |
| K_{oc} | coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ |
| K_{om} | coefficient de la répartition normalisé basé sur la teneur en matière organique | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ |
| K_F^{ads} | coefficient d'adsorption de Freundlich | $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$ |
| $1/n$ | exposant de Freundlich | |
| D_{t_i} | pourcentage de désorption à l'instant t_i | % |
| $D_{\Delta t_i}$ | pourcentage de désorption durant l'intervalle de temps Δt_i | % |
| K_{des} | coefficient de désorption apparente | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ |
| K_F^{des} | coefficient de désorption de Freundlich | $\mu\text{g}^{-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^1$ |
| $m_{aq}^{des}(t_i)$ | masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant t_i | μg |
| $m_m^{des}(\Delta t_i)$ | masse de substance désorbée à partir du sol durant l'intervalle de temps Δt_i | μg |
| $m_m^{des}(eq)$ | masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption | μg |
| $m_{aq}^{des}(eq)$ | masse totale de substance désorbée à l'équilibre de désorption | μg |
| $m_s^{des}(\Delta t_i)$ | masse de substance restant adsorbée sur le sol après l'intervalle de temps Δt_i | μg |
| m_{aq}^A | masse de substance résiduelle après atteinte de l'équilibre d'adsorption due à un volume de remplacement insuffisant | μg |
| $C_s^{des}(eq)$ | concentration de la substance restant adsorbée dans le sol à l'équilibre de désorption | $\mu\text{g g}^{-1}$ |

▼B

| Symbole | Définition | Unités |
|---|--|-----------------------|
| $C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ | concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption | $\mu\text{g cm}^{-3}$ |
| V_{T} | volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle | cm^3 |
| V_{R} | volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume identique d'une solution de 0,01 M de CaCl_2 | cm^3 |
| v_{a}^{D} | volume de l'aliquote extrait du tube (i) pour analyse lors de l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle | cm^3 |
| V_{r}^{i} | volume de solution extrait du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (méthode parallèle) | cm^3 |
| V_{r}^{F} | volume de solution extrait du tube afin de mesurer la substance à l'équilibre de désorption | cm^3 |
| MB | bilan matière | % |
| m_{t} | masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du tube d'essai | μg |
| V_{rec} | volume de surnageant récupéré après l'équilibre d'adsorption | cm^3 |
| P_{ow} | coefficient de partage octanol/eau | |
| pKa | constante de dissociation | |
| S_{w} | solubilité dans l'eau | g l^{-1} |

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des volumes connus de la substance, non marquée ou radiologiquement marquée, mélangée à des concentrations connues de CaCl_2 0,01 M, sont ajoutés à des échantillons de sol d'un poids sec connu, préalablement équilibrés dans du CaCl_2 0,01 M. Le mélange est agité pendant le temps requis. Les particules du sol en suspension sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration, puis la phase aqueuse est analysée. La quantité de substance adsorbée sur le sol correspond à la différence entre la quantité de substance initialement présente dans la solution et la quantité restant à la fin de l'expérience (méthode indirecte).

La quantité de substance adsorbée peut également être directement calculée par l'analyse du sol (méthode directe). Cette méthode, qui consiste à extraire progressivement le sol au moyen d'un solvant approprié, est recommandée lorsque l'on ne peut pas déterminer avec précision les écarts de concentration de la substance dans la solution, par exemple dans les cas suivants: adsorption de la substance sur la surface des tubes d'essai, instabilité de la substance au cours de l'expérience, faible adsorption modifiant peu la concentration de la substance dans la solution, forte adsorption entraînant une faible concentration ne pouvant être mesurée avec précision. L'utilisation d'une substance radioactivement marquée permet d'éviter d'extraire le sol. On analyse dans ce cas la phase du sol par combustion et comptage à scintillation liquide. Cette dernière méthode, non spécifique, ne permet cependant pas de distinguer les produits primaires des produits de transformation. Elle ne devrait donc être utilisée que si la substance à tester reste stable pendant toute la durée de l'étude.

▼B

1.5. INFORMATION SUR LA SUBSTANCE

Les réactifs chimiques doivent être purs. On recommande l'emploi de substances non marquées de composition connue et présentant de préférence un degré de pureté d'au moins 95 % ou de substances radioactivement marquées de composition connue et radioactivement pures. Il faut appliquer des corrections pour tenir compte de la désintégration lorsque l'on emploie des traceurs à demi-vie courte.

Les paramètres suivants doivent être connus avant de réaliser un essai d'adsorption/désorption:

- a) solubilité dans l'eau (A.6);
- b) pression de vapeur (A.4) et/ou constante de la loi de Henry;
- c) dégradation non biologique: hydrolyse en fonction du pH (C.7);
- d) coefficient de partage (A.8);
- e) biodégradabilité facile (C.4) ou transformation aérobie et anaérobie dans le sol;
- f) pKa des substances ionisables;
- g) photolyse directe dans l'eau (c'est-à-dire spectre d'absorption UV-Vis dans l'eau, rendement quantique, par exemple) et photodégradation sur le sol.

1.6. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

L'essai est applicable aux substances chimiques pour lesquelles on dispose d'une méthode analytique suffisamment précise. La stabilité de la substance durant l'essai est un paramètre important qui peut influencer la fiabilité des résultats, notamment avec la méthode indirecte. Il faut donc vérifier la stabilité par une étude préliminaire. Si l'on observe une transformation durant l'essai, il est recommandé d'analyser le sol et les phases aqueuses lors de l'étude principale.

Des difficultés peuvent survenir avec des substances faiblement solubles dans l'eau ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹) ou avec des substances fortement chargées du fait que la concentration de la phase aqueuse ne peut pas être mesurée avec suffisamment de précision avec la méthode analytique. Il faut prendre d'autres mesures dans ces cas. Les moyens d'aborder ces problèmes sont traités dans les points correspondants.

Il faut veiller à éviter les pertes si l'on analyse des substances volatiles.

1.7. MODE OPÉRATOIRE

1.7.1. **Appareillage, réactifs chimiques**

Le laboratoire doit être équipé de l'équipement standard suivant:

- a) tubes ou récipients d'essai. Il est important qu'ils soient:
 - adaptés à la centrifugeuse afin de diminuer les erreurs de manipulation et de transfert,
 - constitués d'un matériau inerte qui diminue l'adsorption de la substance sur les parois:

▼B

- b) agitateur: agitateur vertical ou équipement équivalent: le sol doit être maintenu en suspension pendant l'agitation;
- c) centrifugeuse: elle doit être de préférence à vitesse de rotation élevée (forces de centrifugation > 3 000 g, par exemple), à température contrôlée et capable d'éliminer de la solution aqueuse les particules d'un diamètre supérieur à 0,2 µm. Les récipients doivent être fermés durant l'agitation et la centrifugation afin d'éviter les pertes par volatilité et les pertes en eau; il est recommandé d'utiliser des couvercles désactivés (couvercles filetés recouverts de téflon, par exemple) afin de diminuer l'adsorption sur leur surface;
- d) équipement facultatif; filtres stériles jetables d'une porosité de 0,2 µm. Le matériau filtrant doit être choisi avec soin afin d'éviter l'adsorption de la substance à sa surface; les filtres organiques sont déconseillés pour les substances peu solubles;
- e) instrumentation analytique permettant de mesurer la concentration de la substance;
- f) four de laboratoire permettant de maintenir une température de 103 à 110 °C.

1.7.2. Caractérisation et sélection des sols

Les sols doivent être caractérisés par les trois paramètres principalement responsables de la capacité d'adsorption: le carbone organique, la teneur en argile et la texture, le pH. Comme nous l'avons dit plus haut (voir le point «Objet de la méthode»), d'autres caractéristiques physico-chimiques peuvent influencer sur l'adsorption/désorption d'une substance et elles doivent donc être prises en compte.

Les méthodes de caractérisation des sols revêtent une extrême importance car elles peuvent influencer les résultats de manière significative. Il est donc recommandé de mesurer le pH du sol dans une solution de CaCl₂, 0,01 M (la solution utilisée lors de l'essai d'adsorption/désorption) selon la méthode ISO correspondante (ISO 10390-1). Il est également conseillé de déterminer certaines autres propriétés du sol selon les méthodes standard (par exemple, manuel ISO de l'analyse des sols, «Handbook of Soil Analysis»). On peut ainsi faire reposer l'analyse des données relatives à la sorption sur des paramètres de sol harmonisés. La bibliographie donne quelques références de méthodes harmonisées d'analyse et de caractérisation des sols (50-52). L'utilisation de sols de référence est recommandée pour calibrer les méthodes d'essai des sols.

Le tableau 1 indique comment choisir les sols pour les essais d'adsorption/désorption. Les sept types de sols choisis se rencontrent dans des zones géographiques tempérées. Pour les substances ionisables, les sols sélectionnés doivent couvrir un large spectre de pH pour permettre d'évaluer l'adsorption de la substance sous sa forme ionisée et non ionisée. Le point 1.9 («Réalisation de l'essai») indique combien de sols différents doivent être utilisés durant les diverses phases de l'essai.

Si d'autres types de sols sont choisis, il faut les caractériser au moyen des mêmes paramètres et ils doivent présenter des propriétés aussi diverses que celles décrites dans le tableau 1, même s'ils ne remplissent pas tout à fait les critères.

▼B

Tableau 1

Aide à la sélection des échantillons de sol pour les essais d'adsorption/désorption

| Type de sol | pH (dans le CaCl ₂ 0,01 M) | Teneur en carbone organique (%) | Teneur en argile (%) | Texture du sol ⁽¹⁾ |
|-------------|---------------------------------------|---|------------------------|-------------------------------|
| 1 | 4,5 - 5,5 | 1,0 - 2,0 | 65-80 | argile |
| 2 | > 7,5 | 3,5 - 5,0 | 20-40 | limon argileux |
| 3 | 5,5 - 7,0 | 1,5 - 3,0 | 15-25 | limons fins |
| 4 | 4,0 - 5,5 | 3,0 - 4,0 | 15-30 | limon |
| 5 | < 4,0 - 6,0 ⁽²⁾ | < 0,5 - 1,5 ⁽²⁾ ⁽³⁾ | < 10-15 ⁽²⁾ | sable limoneux |
| 6 | > 7,0 | < 0,5 - 1,0 ⁽²⁾ ⁽³⁾ | 40-65 | limon argileux/ argile |
| 7 | < 4,5 | > 10 | < 10 | sable/sable glaiseux |

⁽¹⁾ Selon la FAO et le système américain (85).

⁽²⁾ Les valeurs des variables doivent être comprises de préférence dans les limites du spectre indiqué. En cas de difficulté à trouver un sol approprié, des valeurs inférieures au minimum indiqué sont acceptées.

⁽³⁾ Les sols contenant moins de 0,3 % de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en carbone organique et l'adsorption. Il est donc recommandé d'utiliser des sols présentant une teneur supérieure à 0,3 %.

1.7.3. Collecte et stockage des échantillons de sols

1.7.3.1. Collecte

Aucune technique ou instrument d'échantillonnage particulier n'est recommandée; la technique d'échantillonnage dépend des objectifs de l'étude (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Il convient de considérer les aspects suivants:

a) il faut disposer d'informations détaillées sur le site d'essai: localisation, couverture végétale, traitement aux pesticides et/ou aux engrais, adjuvants biologiques ou contamination accidentelle. Le site doit être décrit selon les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6);

b) le site d'échantillonnage doit être défini par l'UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ou par des coordonnées géographiques, de manière à pouvoir reconnaître ultérieurement un sol particulier ou à définir un sol en fonction des divers systèmes de classification utilisés dans les différents pays. Il est également recommandé de prélever dans l'horizon A jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm. Si un horizon O_h est présent dans le sol n° 7 en particulier, il doit être inclus dans l'échantillon.

Les échantillons sont transportés dans des conteneurs et dans des conditions thermiques propres à préserver au mieux les propriétés initiales du sol.

▼B1.7.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols fraîchement prélevés. Si cela n'est pas possible, le sol peut être stocké à la température ambiante et maintenu au sec. Aucun temps de stockage maximal n'est recommandé, mais au-delà de trois ans, les sols doivent être à nouveau analysés avant l'emploi afin de vérifier leur teneur en carbone-organique, leur pH et leur CEC.

1.7.3.3. *Manipulation et préparation des échantillons d'essai*

Les sols sont séchés à l'air à la température ambiante (de préférence entre 20 et 25 °C). Ils sont désagrégés en appliquant des forces minimales de manière à modifier aussi peu que possible la texture originale, puis tamisés pour ne conserver que les particules ≤ 2 mm. Le tamisage doit respecter les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6). Une bonne homogénéisation est recommandée car elle améliore la reproductibilité des résultats. La teneur en eau de chaque sol est déterminée à partir de trois aliquotes par un réchauffement à 105 °C jusqu'à stabilisation du poids (environ 12 heures). Pour tous les calculs, la masse du sol se réfère à la masse sèche à l'étuve, c'est-à-dire au poids de sol diminué de la teneur en eau.

1.7.4. **Préparation de la substance d'essai devant être appliquée sur le sol**

La substance d'essai est dissoute dans une solution de CaCl_2 0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée; la solution de CaCl_2 est utilisée comme solvant aqueux pour améliorer la centrifugation et diminuer les échanges de cations. La concentration de la solution mère doit être supérieure de 3 ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode d'analyse utilisée. Ce seuil permet de faire des mesures précises avec la méthodologie employée lors de l'essai. Enfin, la concentration de la solution de réserve doit être inférieure à la solubilité dans l'eau de la substance.

Il est conseillé de préparer la solution de réserve immédiatement avant de l'appliquer sur le sol et de la conserver dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à une température de 4 °C. La durée de stockage dépend de la stabilité de la substance et de sa concentration dans la solution.

Un agent solubilisant peut être utilisé pour les substances peu solubles ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) qui se dissolvent difficilement. Il doit être miscible avec l'eau, comme le méthanol ou l'acétonitrile: sa concentration ne doit pas dépasser 1 % du volume total de la solution de réserve et elle doit être inférieure à celle de la substance dans la solution qui entrera en contact avec le sol (de préférence moins de 0,1 %); il ne doit pas être un surfactant ou subir des réactions solvolytiques avec la substance d'essai. Le procès-verbal d'essai doit indiquer qu'un tel agent a été employé et en donner les raisons.

Un autre moyen de traiter les substances peu solubles consiste à introduire la substance d'essai dans le système d'essai à l'aide d'un solvant auxiliaire: la substance est dissoute dans un solvant organique, dont une fraction est ajoutée au système constitué par le sol et par une solution 0,01 M de CaCl_2 dans de l'eau distillée ou désionisée. La concentration du solvant organique dans la phase aqueuse devrait être aussi faible que possible et ne pas excéder en principe 0,1 %. L'expérimentateur devra toutefois tenir compte du fait que l'introduction de la substance à l'aide d'une solution organique est susceptible de nuire à la reproductibilité des volumes. La concentration de la substance d'essai et du solvant auxiliaire risquent donc de varier légèrement entre les essais et d'introduire une erreur supplémentaire.

▼B

1.8. CONDITIONS PRÉALABLES À LA RÉALISATION DE L'ESSAI D'ADSORPTION/DÉSORPTION

1.8.1. **Méthode analytique**

Un certain nombre de paramètres peuvent influencer la précision des mesures: la précision de la méthode d'analyse de la solution et des phases adsorbées, la stabilité et la pureté de la substance, le temps pour atteindre l'équilibre de sorption, l'étendue des variations de concentration de la solution, le rapport sol/solution et les modifications de la structure du sol au cours du processus d'équilibrage (35) (59-62). L'appendice 2 donne quelques exemples à ce propos.

La fiabilité de la méthode d'analyse doit être vérifiée selon la gamme de concentration susceptible d'être celle rencontrée durant l'essai. L'expérimentateur est libre d'élaborer une méthode appropriée présentant toutes les qualités requises en matière de précision, d'exactitude, de reproductibilité, de limites de détection et de récupération. L'expérience ci-dessous montre comment effectuer un tel essai.

Un volume approprié de CaCl_2 , 0,01 M (100 cm^3 , par exemple), est agité pendant 4 heures avec un certain poids de sol (20 g, par exemple) hautement adsorbant, c'est-à-dire riche en carbone organique et en argile. Le poids et le volume varient selon les besoins de l'analyse mais un rapport sol/solution de 1:5 constitue un bon point de départ. Le mélange est centrifugé et la phase aqueuse filtrée. Une partie de la solution de réserve de la substance est ajoutée à cette dernière afin d'obtenir une concentration nominale comprise dans la gamme de concentration correspondant à celle de l'essai. Ce volume ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de prééquilibre. La solution est ensuite analysée.

Un témoin constitué du système du sol et de la solution de CaCl_2 (sans substance d'essai) doit être ajouté afin de vérifier les artefacts de la méthode d'analyse et les effets de matrice induits par le sol.

La chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectrométrie (CG/spectrométrie de masse, HPLC/spectrométrie de masse) et le comptage à scintillation liquide (pour les substances radiologiquement marquées) figurent parmi les méthodes de mesure de la sorption. Un taux de récupération de 90 à 110 % de la valeur nominale est jugé satisfaisant quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. La limite de détection de la méthode d'analyse doit être d'au moins de deux ordres de grandeur inférieure à la concentration nominale afin de permettre la détection et l'évaluation une fois que le partage est effectué.

Les caractéristiques et la limite de détection de la méthode utilisée pour effectuer les études d'adsorption déterminent les conditions d'essai et les résultats expérimentaux. La méthode présentée ici suit un protocole expérimental général et propose des solutions de rechange lorsque la méthode analytique ou les équipements de laboratoire imposent des limites.

▼B

1.8.2. Choix de rapports sol/solution optimaux

Les rapports sol/solution appropriés à l'étude de la sorption sont choisis en fonction du coefficient de répartition K_d et du degré relatif d'adsorption souhaité. Le changement de la concentration de la substance dans la solution détermine la précision statistique de la mesure, fondée sur la forme de l'équation d'adsorption et sur la limite de la méthode d'analyse, ainsi que l'exactitude avec laquelle elle permettra de détecter la substance contenue dans la solution. Il est donc utile de déterminer plusieurs rapports fixes présentant un pourcentage adsorbé supérieur à 20 % ou, de préférence, à 50 % (62), tout en veillant à ce que la concentration de la substance dans la phase aqueuse reste suffisamment élevée pour pouvoir être mesurée avec précision, notamment lorsque les pourcentages d'adsorption sont importants.

Une solution pratique consiste à choisir les rapports sol/solution en estimant la valeur du coefficient de répartition K_d lors d'études préliminaires ou par des techniques d'estimation bien établies (voir l'appendice 3). On peut ensuite porter sur un graphique le rapport sol/solution en fonction du coefficient de distribution pour différents pourcentages fixes d'adsorption (figure 1). Dans le graphique ci-dessous, on estime que l'équation d'adsorption est linéaire⁽¹⁾. La relation est obtenue en réécrivant l'équation 4 du K_d sous la forme suivante 1:

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

ou sous sa forme logarithmique, en supposant que $R = m_{\text{soil}}/V_0$ et

$$A_{\text{eq}} \%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}} \%/100)}{(1 - A_{\text{eq}} \%/100)} \right] \quad (2)$$

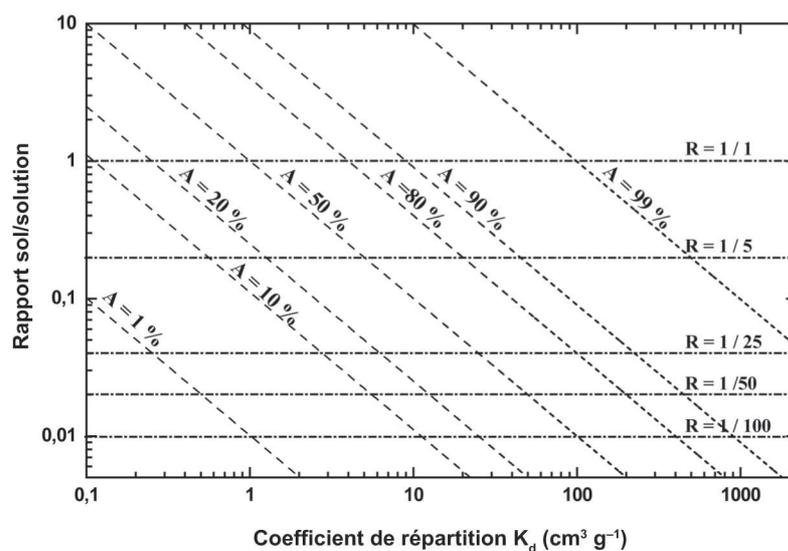


Figure 1. Relation entre les rapports sol/solution et K_d pour différents pourcentages d'adsorption de la substance

⁽¹⁾ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

▼B

La figure 1 montre le rapport sol/solution requis en fonction de K_d pour divers niveaux d'adsorption. Par exemple, avec un rapport sol/solution de 1:5 et un K_d de 20, l'adsorption serait de 80 % environ. Pour obtenir un pourcentage d'adsorption de 50 % avec le même K_d , il faudrait un rapport de 1:25. Cette méthode souple permet de choisir les rapports sol/solution en fonction des besoins de l'expérience.

Les zones où la substance est très fortement ou très légèrement adsorbée sont plus difficiles à maîtriser. En cas de faible adsorption, un rapport sol/solution de 1:1 est recommandé, mais des ratios plus faibles peuvent être nécessaires avec certains types de sols très organiques afin d'obtenir une boue. Avec la méthode analytique, il faut veiller à mesurer les légères variations de concentration de la substance, faute de quoi la mesure d'adsorption sera inexacte. Avec un coefficient de distribution K_d très élevé, on peut aller jusqu'à un rapport de 1:100 de manière à conserver une quantité importante de substance en solution. Il faut cependant bien mélanger et donner au système le temps de s'équilibrer. On peut aussi prédire la valeur K_j au moyen de techniques d'estimation fondées par exemple sur la valeur P_{ow} (voir l'appendice 3). Cette méthode peut être utile pour les substances chimiques polaires ou faiblement adsorbées ayant un $P_{ow} < 20$ et pour les substances lipophiles ou fortement sorbantes dotées d'un $P_{ow} > 10^4$.

1.9. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.9.1. **Conditions de l'essai**

Les essais sont réalisés à température ambiante et, si possible, à une température constante comprise entre 20 et 25 °C.

La centrifugation doit permettre d'éliminer de la solution les particules supérieures à 0,2 µm. Cette valeur correspond à la plus petite particule considérée comme une particule solide et constitue la limite entre les particules solides et les colloïdes. L'appendice 4 explique comment déterminer les paramètres de la centrifugation.

Si l'équipement de centrifugation ne permet pas d'éliminer à coup sûr les particules supérieures à 0,2 µm, on peut combiner la centrifugation et la filtration avec des filtres de 0,2 µm. Ces filtres doivent être fabriqués en matériau inerte afin d'éviter les pertes de substance. Il faut dans tous les cas apporter la preuve qu'il n'y a aucune perte de substance au cours de la filtration.

1.9.2. **Phase 1 — Étude préliminaire**

Le but de l'étude préliminaire a déjà été expliqué dans le point «Objet de la méthode». La réalisation de l'essai est exposée ci-après.

1.9.2.1. *Sélection de rapports sol/solution optimaux*

On utilise deux types de sols et trois rapports sol/solution (six essais). Un sol a une teneur en carbone organique élevée et une faible teneur en argile, l'autre une faible teneur en carbone organique et une teneur élevée en argile. Les rapports suivants sont proposés:

— 50 g de sol et 50 cm³ de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:1),

▼B

- 10 g de sol et 50 cm³ de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:5),
- 2 g de sol et 50 cm³ de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:25).

La quantité minimale de sol qui va servir à l'expérience dépend de l'équipement de laboratoire dont on dispose et des performances des méthodes analytiques utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser au moins 1 g, de préférence 2 g, afin d'obtenir des résultats d'essai fiables.

Un échantillon de contrôle contenant uniquement la substance d'essai dans une solution de CaCl₂ 0,01 M (sans sol) est soumise exactement aux mêmes opérations que le système d'essai afin de vérifier la stabilité de la substance dans une solution de CaCl₂ et son adsorption éventuelle à la surface des récipients d'essai.

Un témoin par sol contenant la même quantité de sol dans un volume total de 50 cm³ de solution de CaCl₂ 0,01 M (sans substance) est soumis à la même procédure d'essai. Il permet de détecter les substances étrangères ou les sols contaminés.

Tous les essais, contrôles et témoins sont réalisés au moins en double. Le nombre total d'échantillons devant être préparés pour l'étude est calculé selon la méthode suivie.

L'étude préliminaire et l'étude principale reposent sur les mêmes méthodes, sauf indication contraire.

Les échantillons de sols séchés à l'air sont mélangés à un volume minimal de 45 cm³ de CaCl₂ 0,01 M et agités pendant 12 heures la nuit précédant l'expérience. On y ajoute par la suite de la solution de réserve de la substance d'essai afin d'obtenir un volume final de 50 cm³. Ce volume ajouté ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse (50 cm³) afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de prééquilibrage. Par ailleurs, la concentration initiale de la substance d'essai en contact avec le sol (C_0) doit être supérieure d'au moins deux ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode analytique. Ce seuil permet d'obtenir des mesures fiables, même en cas d'adsorption élevée (> 90 %) et de déterminer ultérieurement les isothermes d'adsorption. La concentration (C_0) de la substance initiale ne devrait pas non plus excéder la moitié de sa limite de solubilité.

Voici comment calculer la concentration de la solution de réserve (C_M). Si la limite de détection est de 0,01 µg cm⁻³ et l'adsorption de 90 %, la concentration initiale de la substance en contact avec le sol sera de préférence de 1 µg cm⁻³ (soit de deux ordres de grandeur plus élevée que celle de la limite de détection). En supposant que l'on ajoute le volume maximal recommandé de la solution de réserve, soit 5 cm³, aux 45 cm³ de la solution d'équilibrage de CaCl₂ 0,01 M (c'est-à-dire 10 % de la solution de réserve au volume total de la phase aqueuse), la concentration de la solution de réserve sera de 10 µg cm⁻³, ce qui est de trois ordres de grandeur supérieur à la limite de détection de la méthode analytique.

Il faut mesurer le pH de la phase aqueuse avant et après le contact avec le sol, compte tenu de son rôle dans le processus d'adsorption, notamment dans le cas des substances ionisables.

▼B

Le mélange est agité jusqu'à ce que le point d'équilibre soit atteint. Le temps d'équilibre dans les sols est très variable. Il dépend du produit chimique et du sol. Une période de 24 heures est généralement suffisante (77). Lors de l'étude préliminaire, des échantillons peuvent être prélevés de manière séquentielle pendant une période de mélange de 48 heures (à la 4^e, 8^e, 24^e et 48^e heure, par exemple). Les temps d'analyse ne sont pas rigides et doivent être considérés en fonction du programme de travail du laboratoire.

La substance dans la solution aqueuse peut être mesurée par la méthode parallèle ou par la méthode séquentielle. La méthode parallèle est plus difficile à réaliser sur le plan expérimental mais le traitement mathématique des résultats est plus simple (voir l'appendice 5). Le choix de la méthode est laissée à l'appréciation de l'expérimentateur, qui décide en fonction des équipements de laboratoire et des ressources disponibles.

- a) Méthode parallèle: on prépare des échantillons avec un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique d'adsorption. Après centrifugation et, le cas échéant, filtration, la phase aqueuse du premier tube est récupérée aussi complètement que possible et mesurée au bout de 4 heures, par exemple, celle du deuxième tube au bout de 8 heures, celle du troisième au bout de 24 heures, etc.
- b) Méthode séquentielle: on prépare uniquement un double échantillon pour chaque rapport sol/solution. Le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance, puis l'expérience se poursuit avec le mélange original. S'il y a filtration après centrifugation, le laboratoire doit disposer d'équipements permettant de filtrer de petites aliquotes en phase aqueuse. Le volume total des aliquotes ne devrait pas dépasser 1 % du volume total de la solution afin de ne pas modifier de manière significative le rapport sol/ solution et de diminuer la masse de soluté susceptible d'être adsorbée durant l'essai.

Le pourcentage d'adsorption A_t est calculé à chaque instant (t_t) sur la base de la concentration initiale nominale et de la concentration mesurée au temps d'échantillonnage (t_t), corrigé de la valeur du témoin. Des graphes A_t représentant en fonction du temps (figure 1, appendice 5) sont tracés afin de savoir à quel moment le plateau d'équilibre est atteint⁽¹⁾. On calcule également la valeur K_d à l'équilibre. On choisit à partir de cette valeur le rapport sol/solution approprié de la figure 1, de manière que le pourcentage d'adsorption dépasse 20 % et, de préférence, 50 % (61). Les équations et les principes relatifs au tracé sont exposés au point «Présentation des données» ainsi qu'à l'appendice 5.

1.9.2.2. Détermination du temps d'adsorption et de la quantité de substance adsorbée à l'équilibre

Comme nous l'avons déjà dit, le graphe représentant A_t ou C_{aq}^{ads} en fonction du temps permet d'estimer l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre (voir les figures 1 et 2 de l'appendice 5). Le temps d'équilibre correspond au temps que le système met pour atteindre un plateau.

⁽¹⁾ On peut également utiliser des graphiques de concentration de la substance en phase aqueuse (C_{aq}^{ads}) en fonction du temps pour estimer l'obtention du plateau d'équilibre (voir la figure 2 de l'appendice 5).

▼B

L'absence de plateau ou l'accroissement progressif de la courbe peut être dû à des facteurs complexes tels que b. biodégradation ou une diffusion lente. La biodégradation peut être mise en évidence en répétant l'expérience avec un échantillon de sol stérile. Si aucun plateau n'est atteint même dans ce cas, l'expérimentateur doit chercher d'autres causes inhérentes à l'étude. Il peut par exemple modifier les conditions de l'essai (température, temps d'agitation, rapport sol/solution). Lui seul décide de poursuivre la procédure d'essai, même s'il court le risque de ne pas atteindre un équilibre.

1.9.2.3. *Adsorption sur les parois du récipient et stabilité de la substance*

L'analyse des échantillons de contrôle peut fournir quelques informations sur l'adsorption de la substance sur les parois des récipients d'essai ainsi que sur sa stabilité. Une déplétion supérieure à l'écart type de la méthode analytique peut être due à une dégradation abiotique et/ou à l'adsorption sur les parois du récipient. On peut individualiser l'un ou l'autre de ces phénomènes en lavant soigneusement les parois du récipient avec un volume connu de solvant, puis en recherchant la substance dans la solution de lavage. L'absence d'adsorption sur les parois du récipient prouve l'instabilité abiotique de la substance. En cas d'adsorption, en revanche, il convient de modifier le matériau du récipient d'essai. Ces données sur l'adsorption sur les parois des récipients d'essai ne peuvent cependant pas être directement extrapolées à l'essai sol/solution, dans la mesure où la présence de sol modifie l'adsorption.

On peut obtenir des informations supplémentaires sur la stabilité de la substance d'essai en déterminant le bilan matière dans le temps. La substance est recherchée dans la phase aqueuse, dans les extraits de sol et sur les parois des récipients d'essai. La différence entre la masse de la substance ajoutée et la somme des masses de substance présentes dans la phase aqueuse, les extraits de sol et sur les parois des récipients correspond à la masse dégradée, volatilisée et/ou non extraite. Pour effectuer un bilan matière, l'équilibre d'adsorption doit être atteint durant l'essai.

Le bilan matière est effectué sur les deux sols et avec un rapport sol/solution par sol générant une déplétion à l'équilibre supérieure à 20 % et, de préférence, à 50 %. Une fois que l'essai consistant à trouver le rapport sol/solution est terminé (analyse du dernier échantillon de phase aqueuse au bout de 48 heures), les phases sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration. Le maximum de phase aqueuse est récupérée puis un solvant d'extraction approprié (c'est-à-dire doté d'un coefficient d'extraction d'au moins 95 %) est ajouté au sol afin d'extraire la substance. Deux extractions successives au moins sont recommandées. On détermine ensuite la quantité de substance présente dans les extraits de sol et dans le récipient afin de calculer le bilan matière (équation 10 du chapitre «Présentation des données»). S'il est inférieur à 90 %, la substance est jugée instable durant la durée de l'essai. Les études peuvent être poursuivies en tenant compte de cette instabilité. Il est conseillé dans ce cas d'analyser les deux phases lors de l'étude principale.

▼B1.9.2.4 *Phase 2 — Cinétique d'adsorption avec une concentration unique de substance*

Cinq sols choisis dans le tableau 1 sont utilisés à cet effet. On a intérêt à y inclure tout ou partie des sols utilisés dans l'étude préliminaire. Dans ce cas, ils ne sont pas soumis aux essais de la phase 2.

Le temps d'équilibre, le rapport sol/solution, le poids de l'échantillon de sol, le volume de la phase aqueuse en contact avec le sol et la concentration de la substance d'essai dans la solution sont choisis en fonction des résultats de l'étude préliminaire. L'analyse doit être effectuée de préférence après un temps de contact de 2, 4, 6, 8 (éventuellement 10) et 24 heures. Le temps d'agitation peut être étendu à 48 heures maximum lorsque les résultats sur le rapport sol/solution font ressortir un temps d'équilibre plus long. Les temps d'analyse doivent être considérés avec une certaine souplesse.

Chaque expérience (un sol et une solution) est effectuée au moins en double afin d'évaluer la variance des résultats. Un témoin est préparé pour chacune d'elle avec du sol et de la solution de CaCl_2 0,01 M, sans substance d'essai, d'un poids et d'un volume identiques aux échantillons d'essai. Un échantillon de contrôle préparé uniquement à partir de la substance d'essai contenue dans une solution de CaCl_2 0,01 M (sans sol) est soumis à la même procédure d'essai afin de se prémunir contre l'imprévu.

Le pourcentage d'adsorption est calculé à chaque instant A_t et/ou intervalle de temps $A_{\Delta t}$ (selon les besoins). Il est porté sur un graphe en fonction du temps. Le coefficient de distribution K_d à l'équilibre ainsi que le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique K_{oc} (pour les substances chimiques non polaires) sont également calculés.

Résultats de l'essai de cinétique d'adsorption

La valeur linéaire K_d , qui exprime la mobilité inhérente des substances chimiques dans le sol, est généralement suffisamment précise pour décrire le comportement de sorption du sol (35)(78). Les substances chimiques dont K_d est $\leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ sont en général considérées comme étant mobiles. Mac Gall et coll. ont élaboré un système de classification de la mobilité fondé sur les valeurs K_{oc} (16). Il existe également des systèmes de classification de la lixiviation fondés sur la relation entre K_{oc} et DT-50 ⁽¹⁾ (32) (79).

Selon les études d'analyse d'erreurs (61), les valeurs K_d inférieures à $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ne peuvent pas être estimées avec précision à partir d'une diminution de la concentration dans la phase aqueuse, même si l'on applique le rapport sol/solution le plus favorable (sur le plan de la précision), c'est-à-dire 1:1. Dans ce cas, l'analyse des deux phases (sol et solution) est recommandée.

⁽¹⁾ DT-50: temps de dégradation de 50 % de la substance d'essai.

▼B

En ce qui concerne les remarques précédentes, il est conseillé de poursuivre l'étude du comportement de sorption d'un produit chimique dans le sol et de sa mobilité potentielle en déterminant les isothermes d'adsorption de Freundlich des systèmes dont on peut déterminer précisément K_d grâce au protocole expérimental suivi dans la présente méthode. Il suffit pour cela que la valeur obtenue en multipliant K_d avec le rapport sol/solution soit $> 0,3$ — lorsque les mesures reposent sur la baisse de concentration de la phase aqueuse (méthode indirecte) — ou $> 0,1$ lorsque les deux phases sont analysées (méthode directe) (61).

1.9.2.5 *Phase 3 — Isothermes d'adsorption, cinétique de désorption et isothermes de désorption*

1.9.2.5.1 Isothermes d'adsorption

On utilise cinq concentrations de substances d'essai couvrant de préférence deux ordres de grandeur. La solubilité dans l'eau et les concentrations à l'équilibre de la phase aqueuse qui en résultent sont prises en compte lors du choix de ces concentrations. Il convient de garder le même rapport sol/solution par sol tout au long de l'étude. L'essai d'adsorption est effectué selon la description ci-dessus, à la différence près que la phase aqueuse est analysée une seule fois, au moment où le point d'équilibre déterminé au cours de la phase 2 est atteint. Les concentrations à l'équilibre dans la solution sont déterminées et la quantité adsorbée est calculée à partir de la déplétion de la substance dans la solution ou avec la méthode directe. La masse adsorbée par unité de masse de sol est portée sur un graphe en fonction de la concentration à l'équilibre de la substance (voir le chapitre «Présentation des données»).

Résultats de l'essai relatif aux isothermes d'adsorption

De tous les modèles mathématiques d'adsorption proposés jusqu'à présent, l'isotherme de Freundlich est le plus fréquemment utilisé pour décrire les processus d'adsorption. On peut trouver de plus amples informations sur l'interprétation et l'importance des modèles d'adsorption dans la bibliographie (41) (45) (80) (81) (82).

Remarque: il est bon de mentionner qu'une comparaison des valeurs K_F (coefficient d'adsorption de Freundlich) de différentes substances n'est possible que si ces valeurs sont exprimées en unités identiques (83).

1.9.2.5.2 Cinétique de désorption

Cet essai vise à évaluer le caractère réversible ou irréversible de l'adsorption d'une substance sur un sol. C'est une information importante dans la mesure où le processus de désorption joue un rôle non négligeable dans le comportement d'une substance chimique dans un sol. Ces données sur la désorption peuvent également servir à élaborer des modèles informatisés de simulation du lessivage et de l'écoulement des substances dissoutes. Si l'on souhaite effectuer une étude de désorption, il est conseillé d'effectuer l'étude ci-après pour tous les systèmes dont on aura pu déterminer K_d au cours de l'essai sur la cinétique d'adsorption précédent.

Comme pour l'étude sur la cinétique d'adsorption, l'essai sur la cinétique de désorption peut se faire selon la méthode parallèle ou la méthode séquentielle. Le choix de la méthode est laissé à l'appréciation de l'expérimentateur, qui devra considérer les disponibilités en équipements de laboratoire et en ressources.

▼B

- a) méthode parallèle: on prépare, pour chaque sol inclus dans l'étude de désorption, des échantillons ayant un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique de désorption. Il est préférable d'utiliser les mêmes intervalles de temps que pour l'étude sur la cinétique d'adsorption. Le temps total peut cependant être étendu de manière que le système parvienne à l'équilibre de désorption. On prépare un témoin pour chaque expérience (un sol, une solution) à partir de sol et d'une solution de CaCl_2 0,01 M (sans substance d'essai), d'un poids et d'un volume identiques à ceux de l'expérience. La substance d'essai dans une solution de CaCl_2 0,01 M (sans sol) est soumise à la même procédure d'essai en tant qu'échantillon de contrôle. Tous les mélanges sol/solution sont agités jusqu'à l'équilibre d'adsorption (tel qu'il a été déterminé dans la phase 2). Les phases sont ensuite séparées par centrifugation et les phases aqueuses sont extraites le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de CaCl_2 0,01 M ne contenant pas de substance d'essai et ces mélanges sont à nouveau agités. La phase aqueuse du premier tube est récupérée le plus complètement possible puis mesurée après 2 h, par exemple, celle du deuxième tube après 4 h, celle du troisième après 6 h, etc., jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint.
- b) méthode séquentielle: après l'essai de cinétique d'adsorption, le mélange est centrifugé et la phase aqueuse est extraite le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de CaCl_2 0,01 M sans substance d'essai. Ce mélange est agité jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint. Pendant ce temps, le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance d'essai, puis on poursuit l'expérience avec le mélange original. Le volume de chaque aliquote ne devrait pas dépasser 1 % du volume total. La même quantité de solution fraîche de CaCl_2 0,01 M est ajoutée au mélange afin de maintenir le rapport sol/solution, puis celui-ci est agité jusqu'au prochain intervalle de temps.

Le pourcentage de désorption est calculé à chaque temps ((D_t)) et/ou intervalle de temps ($(D_{\Delta t})$) (selon les besoins de l'étude), puis il est porté sur un graphique en fonction du temps. Le coefficient de désorption K_{des} à l'équilibre est également calculé. Toutes les équations applicables sont données dans le chapitre «Présentation des données» de l'annexe 5.

Résultats de l'essai de cinétique de désorption

L'inscription sur un même graphe du pourcentage de désorption D_t et d'adsorption A_t en fonction du temps permet d'estimer la réversibilité du processus d'adsorption. L'adsorption est jugée réversible si l'équilibre de désorption est atteint avant le double de temps nécessaire à l'équilibre d'adsorption et si la désorption totale est supérieure à 75 % de la quantité adsorbée.

1.9.2.5.3 Isothermes de désorption

Les isothermes de désorption de Freundlich sont déterminés sur les sols utilisés lors de l'expérience relative aux isothermes d'adsorption. L'essai de désorption est réalisé selon les modalités décrites dans le chapitre «Cinétique de désorption», à la différence près que la phase aqueuse n'est analysée qu'une fois, à l'équilibre de désorption. On calcule ensuite la quantité de substance désorbée. La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est portée sur un graphe en fonction de la concentration d'équilibre de la substance d'essai en solution (voir le chapitre «Présentation des données» et l'annexe 5).

▼B**2. PRÉSENTATION DES DONNÉES**

Les données analytiques sont présentées sous forme de tableaux (voir l'annexe 6) dans lesquels figurent les mesures et les moyennes calculées. Les isothermes d'adsorption sont représentés sous forme de graphiques. Les calculs sont effectués selon les modalités présentées ci-après.

Pour les besoins de l'essai, on estime que le poids de 1 cm³ de solution aqueuse est de 1 g. Le rapport sol/solution peut être exprimé en M/M ou M/vol.

2.1 ADSORPTION

L'adsorption (A_{t_i}) est définie comme le pourcentage de substance adsorbée sur le sol en fonction de la quantité présente au début de l'essai, dans les conditions de l'essai. Si la substance est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur la paroi du récipient, A_{t_i} est calculé à chaque instant t_i selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

où:

A_{t_i} = est le pourcentage d'adsorption à l'instant t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = est la masse de substance d'essai adsorbée sur le sol durant le temps t_i (µg);

m_0 = est la masse de substance dans le tube au début de l'essai (µg).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur le mode de calcul du pourcentage d'adsorption A_{t_i} avec les méthodes parallèles et séquentielles.

Le coefficient de répartition K_d est le rapport entre le contenu de la substance dans le sol et sa concentration massique dans la solution aqueuse, dans les conditions d'essai, lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint.

Soit:

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

où:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg g⁻¹);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg cm⁻³). Elle est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins.

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg);

m_{soil} = est la quantité de phase de sol exprimée en masse sèche de sol (g);

V_0 = est le volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol (cm³).

La relation entre A_{eq} et K_d est donnée par l'équation suivante:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

▼B

où:

A_{eq} = est le pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

Le coefficient normalisé basé sur la teneur en carbone organique K_{oc} lie le coefficient de répartition K_d à la teneur en carbone organique de l'échantillon de sol:

soit:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

où:

$\%OC$ = est le pourcentage de carbone organique dans l'échantillon de sol (g g⁻¹).

Le coefficient K_{oc} représente une valeur unique qui caractérise principalement le partage de substances chimiques non polaires entre le carbone organique dans le sol ou sédiment et eau. L'adsorption de ces substances est liée à la teneur organique du solide adsorbant (7); les valeurs K_{oc} dépendent donc des caractéristiques spécifiques des fractions humiques dont la capacité de sorption varie considérablement selon l'origine, la genèse, etc.

2.1.1 Isothermes d'adsorption

L'équation des isothermes d'adsorption de Freundlich lie la quantité de substance adsorbée à la concentration de substance en solution à l'équilibre (équation 8).

Les données sont traitées comme dans le chapitre «Adsorption». On calcule pour chaque tube d'essai la quantité de la substance adsorbée sur le sol après l'essai d'adsorption ($C_s^{ads}(eq)$), noté ailleurs x/m). On suppose que l'équilibre a été atteint et que $C_s^{ads}(eq)$ représente la valeur d'équilibre:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (7)$$

L'adsorption de Freundlich est donnée par l'équation suivante (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

ou, sous sa forme linéaire, par:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

où:

K_F^{ads} = est le coefficient d'adsorption de Freundlich; il se mesure en cm³ g⁻¹ uniquement si 1/n = 1; dans tous les autres cas, la pente 1/n s'écrit K_F^{ads} (μg^{-1/n}(cm³)^{1/n}g⁻¹);

n = est la constante de régression; 1/n est généralement compris entre 0,7 et 1,0, ce qui indique que la donnée de sorption est fréquemment légèrement non linéaire.

Les équations (8) et (9) sont portées sur un graphique et les valeurs K_F^{ads} et 1/n sont calculées au moyen d'une analyse de régression utilisant l'équation 9. Le coefficient de corrélation r² de l'équation logarithmique est également calculé. La figure 2 donne des exemples de graphes.

▼B

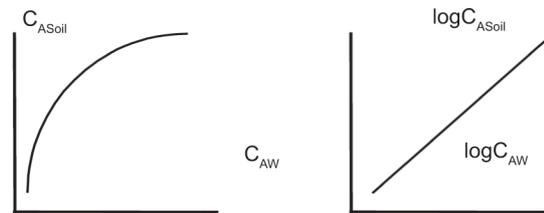


Fig. 2. Graphique d'adsorption de Freundlich, normalisé et linéarisé

2.1.2 Bilan matière

Le bilan matière (MB) correspond au pourcentage de substance récupéré par analyse après un essai d'adsorption par rapport à la quantité nominale de substance présente au début de l'essai.

Le traitement des données est différent si le solvant est complètement miscible avec l'eau. On peut dans ce cas appliquer le traitement des données visé au chapitre « Désorption » pour déterminer la quantité de substance extraite par solvant. Si celui-ci est moins miscible avec l'eau, il convient de déterminer la quantité récupérée.

Le bilan matière de l'adsorption est calculé de la manière suivante: on suppose que le terme (m_E) correspond à la somme des masses de substance extraites du sol et de la surface du récipient d'essai au moyen d'un solvant organique.

soit:

$$MB = \frac{(V_{\text{rec}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

où:

MB = est le bilan matière (%);

m_E = est la masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du récipient (μg);

C_0 = est la concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

V_{rec} = est le volume de surnageant récupéré à l'équilibre d'adsorption (cm^3).

2.2 DÉSORPTION

La désorption (D) est définie comme le pourcentage de substance désorbée, rapporté à la quantité de substance préalablement adsorbée, dans les conditions d'essai:

soit:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

où:

D_{t_i} = est le pourcentage de désorption à l'instant t_i (%);

▼B

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$ = est la masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant t_i , (μg);

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption, (μg).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur la manière de calculer le pourcentage de désorption D_{t_i} par la méthode parallèle et séquentielle.

Le coefficient de désorption apparente (K_{des}) correspond, dans les conditions d'essai, au rapport entre le contenu de la substance restant dans la phase du sol et la concentration massique de la substance désorbée dans la solution aqueuse, lorsque l'équilibre de désorption est atteint:

soit:

$$K_{\text{des}} = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) V_{\text{T}}}{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) m_{\text{soil}}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (12)$$

où:

K_{des} = est le coefficient de désorption ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = est la masse totale de substance désorbée à partir du sol à l'équilibre de désorption (μg);

V_{T} = est le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption (cm^3).

Le chapitre «Désorption» de l'annexe 5 explique comment calculer $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$.

Remarque

Si l'essai d'adsorption a été réalisé avec la méthode parallèle, le volume V_{T} de l'équation (12) est estimé égal à V_0 .

2.2.1 Isothermes de désorption

L'équation des isothermes de désorption de Freundlich relie la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à la concentration de substance en solution à l'équilibre de désorption (équation 16).

La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est calculé pour chaque tube de la manière suivante:

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{soil}}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (13)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ est défini comme:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}}(\mu\text{g}) \quad (14)$$

$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = est la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = est la masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption (μg);

▼ B

m_{aq}^{A} = est la masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un remplacement volumique incomplet (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = est la masse de substance en solution à l'équilibre d'adsorption (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{r}^{F} = est le volume de solution prélevé du tube afin de mesurer la substance, à l'équilibre de désorption (cm^3)

V_{R} = est le volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par le même volume de CaCl_2 0,01 M (cm^3);

L'équation de la désorption de Freundlich s'écrit (16):

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

ou, sous une forme linéaire:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

où:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = est le coefficient de désorption de Freundlich;

n = est la constante de régression;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = est la concentration massique de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Les équations (16) et (17) peuvent être portées sur un graphique et les valeurs $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ et $1/n$ sont calculées au moyen d'une analyse de régression en utilisant l'équation 17.

Remarque:

Si l'exposant d'adsorption ou de désorption de Freundlich $1/n$ est égal à 1, les constantes d'adsorption ou de désorption de Freundlich ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ et $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) sont identiques aux constantes d'adsorption ou de désorption à l'équilibre (K_{d} et K_{des}) et les graphiques de C_{s} en fonction de C_{aq} seront linéaires. Si les exposants ne sont pas égaux à 1, les graphiques de C_{s} en fonction de C_{aq} seront non linéaires et les constantes d'adsorption et de désorption varieront selon les isothermes.

2.2.2 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal doit comprendre les informations suivantes:

- Identification complète des échantillons de sol utilisés, à savoir:
- références géographiques du site (latitude, longitude);
- date de l'échantillonnage;

▼B

- origine (sol agricole, forêt, etc.);
- profondeur de l'échantillonnage;
- contenu en sable/limon/argile;
- valeurs du pH (dans CaCl₂ 0,01M);
- teneur en carbone organique;
- teneur en matière organique;
- teneur en azote;
- rapport C/N;
- capacité d'échange cationique (mmol/kg);
- toutes les informations sur la collecte et le stockage des échantillons de sol;
- le cas échéant, toutes les informations utiles à l'interprétation de l'adsorption et de la désorption de la substance testée;
- la référence aux méthodes utilisées pour déterminer chaque paramètre;
- le cas échéant, des informations sur la substance à tester;
- la température des essais;
- les conditions de centrifugation;
- le procédé utilisé pour analyser la substance;
- les raisons motivant l'emploi d'un agent solubilisant pour préparer la solution de substance de réserve;
- les raisons expliquant les corrections de calcul, le cas échéant;
- les données relatives au formulaire (annexe 6) et à la présentation graphique;
- toutes les informations et observations utiles pour interpréter les résultats des essais.

3.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränze O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), «The sorption of nonpolar organics by soils and sediments» in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil», in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

▼B

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furling C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), «Persistence of herbicides in soil». *J. Sci. Fd Agric*, 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». *Pestic. Sci.* 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), «Process affecting herbicide action in soil». *Pestic. Sci.*, 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». *Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem*, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in *Environmental Dynamics of Pesticides* (eds R. Haque and V.H. Freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), «Pesticide mobility in soils». *Soil Sci. Soc. Amer. Proc*, 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), «Diffusion and volatilization» in *Organic chemicals in the soil environment* (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». *Pestic. Sci.* 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability». *J. Environ. Toxic. Chem.*, 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». *J. of Soil Sci.*, 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». *Pest. Sci.*, 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), «Sorpton estimates for modeling», in *Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2*, pp. 80- 101,
36. Lambert S.M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». *J. Agri. Food Chem.*, 15, 572-576.

▼B

37. Hance R.J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». *J. Agri. Food Chem.*, 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». *Nature*, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor». *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». *J. Agric. Food Chem.*, 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». *Residue Rev.*, 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». *Chemosphere* 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». *Environ. Toxicol. Safety* 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). «Adsorption in organic chemicals» in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C.A.I, and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». *Weed Sci.* 19:67-69.
47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p. 75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 1 1th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. «*Methods of Soil Analysis*», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) «Precision in pesticide adsorption measurements». *Soil Sci. Am. Proa*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J J.T.I., «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106» Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». *J. Environ.QuaL*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J., Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds.* American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp. 78- 115, ASTM STP 707, Philadelphia.

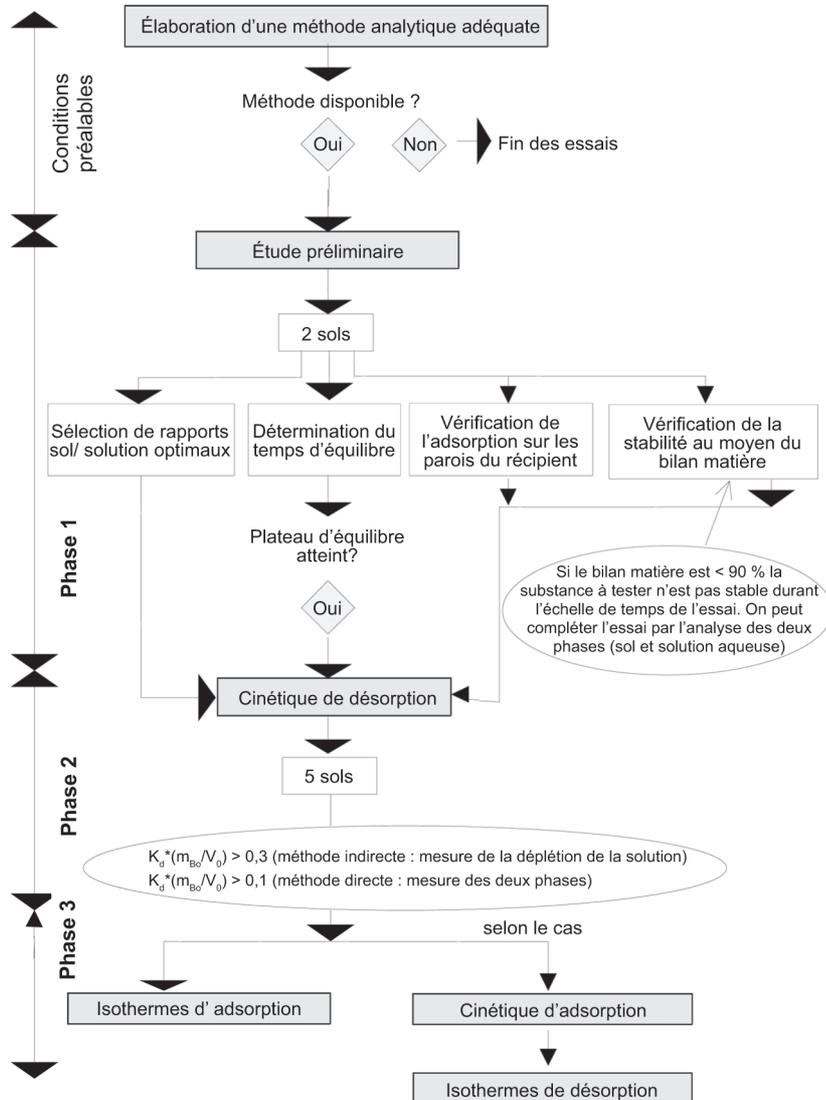
▼B

70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». *Science*, Vol. 206, 831-832.
71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), «Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.* 34 (4), 319-322.
74. Millier M., Kôrdel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kôrdel W., Kotthoff G., Millier M. (1995), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kôrdel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), «The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption». *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), «Adsorption/desorption», in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer.* 26:305 (1962).

▼B

Annexe 1

Organigramme d'essai



▼B

Appendice 2

**LES EFFETS DE LA PRÉCISION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE ET
DES VARIATIONS DE CONCENTRATION SUR LA PRÉCISION DES
RÉSULTATS DE L'ADSORPTION**

Il ressort clairement du tableau suivant (84) que si la différence entre la masse initiale ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) et la masse ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$) de la substance dans la solution à l'équilibre est très faible, une erreur de 5 % dans la mesure de la concentration à l'équilibre fausse de 50 % le calcul de la quantité de la substance adsorbée sur le sol ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) et de 52,4 % le calcul de K_d .

Quantité de sol $m_{\text{sol}} = 10\text{g}$

Volume de solution $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

| | $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg) | $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$) | R | $m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg) | $C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$) | R_{\ddagger} | K_d (*) | R_{\ddagger} |
|--|--|--|---------------|---|--|----------------|-----------|----------------|
| POUR A = 9 % | | | | | | | | |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ou $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$ | 100 | 1,000 | valeur réelle | 10 | 1,00 | valeur réelle | 1 | |
| | 101 | 1,010 | 1 % | 9 | 0,90 | 10 % | 0,891 | 10,9 % |
| | 105 | 1,050 | 5 % | 5 | 0,50 | 50 % | 0,476 | 52,4 % |
| | 109 | 1,090 | 9 % | 1 | 0,10 | 90 % | 0,092 | 90,8 % |
| POUR A = 55 % | | | | | | | | |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ou $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$ | 50,0 | 0,500 | valeur réelle | 60,0 | 6,00 | valeur réelle | 12,00 | |
| | 50,5 | 0,505 | 1 % | 59,5 | 5,95 | 0,8 % | 11,78 | 1,8 % |
| | 52,5 | 0,525 | 5 % | 57,5 | 5,75 | 4,0 % | 10,95 | 8,8 % |
| | 55,0 | 0,550 | 10 % | 55,0 | 5,50 | 8,3 % | 10,00 | 16,7 % |
| POUR A = 99 % | | | | | | | | |
| $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ou $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$ | 1,100 | 0,011 | valeur réelle | 108,9 | 10,89 | valeur réelle | 990 | |
| | 1,111 | 0,01111 | 1 % | 108,889 | 10,8889 | 0,01 % | 980 | 1,0 % |
| | 1,155 | 0,01155 | 5 % | 108,845 | 10,8845 | 0,05 % | 942 | 4,8 % |
| | 1,21 | 0,0121 | 10 % | 108,790 | 10,8790 | 0,10 % | 899 | 9,2 % |

$$(*) \quad m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{sol}}} \quad K_d = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) V_0}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) m_{\text{sol}}}$$

où:

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la masse de substance dans la phase de sol à l'équilibre (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la masse de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre (μg);

$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la concentration de substance dans la phase de sol à l'équilibre ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

R = est l'erreur analytique lors du calcul de $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R_{\ddagger} = est l'erreur calculée due à l'erreur analytique R.

▼B

Appendice 3

TECHNIQUES D'ESTIMATION DE K_d

1. Les techniques d'estimation permettent de prédire K_d en se fondant sur des corrélations avec des valeurs P_{ow} (12) (39) (63-68), avec des données sur l'hydrosolubilité (12) (19) (21) (39) (68-73) ou avec des données sur la polarité obtenues par HPLC en phase inversée (74-76). Comme le montrent les tableaux 1 et 2, on calcule K_{oc} ou K_{om} à partir de ces équations puis on obtient, indirectement, K_d à partir des équations suivantes:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

2. Ces corrélations se fondent sur deux hypothèses: 1) c'est la matière organique du sol qui influence principalement l'adsorption d'une substance: 2) les interactions en jeu sont essentiellement non polaires. Il en résulte que ces corrélations: 1) ne sont pas applicables aux substances polaires, ou uniquement de manière limitée et: 2) qu'elles ne s'appliquent pas lorsque la teneur en matière organique du sol est très faible (12). Par ailleurs, si l'on a trouvé des corrélations satisfaisantes entre P_{ow} et l'adsorption (19), on ne peut pas en dire autant des relations entre l'hydrosolubilité et l'étendue de l'adsorption (19) (21); les études sont par conséquent très contradictoires.
3. Les tableaux 1 et 2 donnent quelques exemples de corrélations entre le coefficient d'adsorption et, respectivement, le coefficient de partage octanol-eau et l'hydrosolubilité.

Tableau 1

Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et le coefficient de partage octanol-eau: pour d'autres exemples voir (12) (68)

| Substances | Corrélations | Auteurs |
|---------------------------------|---|----------------------------------|
| Urée substituée | $\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$ | Briggs (1981) (39) |
| Substances aromatiques chlorées | $\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$ | Chiou et al. (1983) (65) |
| Divers pesticides | $\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$ | Gerstl et Mingelgrin (1984) (66) |
| Hydrocarbures aromatiques | $\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$ | Vowles et Mantoura (1987) (67) |

Tableau 2

Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et l'hydrosolubilité; pour d'autres exemples voir (68) (69)

| Composés | Corrélations | Auteurs |
|--|--|----------------------------------|
| Divers pesticides | $\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$ | Gerstl et Mingelgrin (1984) (66) |
| Substances aliphatiques aromatiques chlorées | $\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$ | Chiou et al. (1979) (70) |
| α -naphthol | $\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$ | Hasset et al. (1981) (71) |
| Substances cycliques aliphatiques chlorées | $\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 \text{ (mp-25)}$ | Karickhoff (1981) (72) |
| Divers composés | $\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$ | Moreale van Blade (1982) (73) |

▼B

Appendice 4

CALCUL DES CONDITIONS DE CENTRIFUGATION

1. Le temps de centrifugation est donné par la formule suivante (on suppose que les particules sont sphériques):

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Par commodité, tous les paramètres sont indiqués en unités n'appartenant pas au SI (g, cm)

où:

ω = vitesse de rotation (= 2π rpm/60), rad s⁻¹

rpm = tours par minute;

η = viscosité de la solution, g s⁻¹ cm⁻¹

r_p = rayon des particules, cm

ρ_s = densité du sol, g cm⁻³

ρ_{aq} = densité de la solution, g cm⁻³

R_t = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et le haut de la solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

R_b = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et la base du tube de la centrifugeuse, cm

$R_b - R_t$ = longueur du mélange sol/solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

Dans la pratique, le double du temps calculé est nécessaire pour obtenir une séparation complète.

2. On peut simplifier l'équation (1) si l'on considère que la viscosité (η) et la densité (ρ_{aq}) de la solution sont égales à la viscosité et à la densité de l'eau à 25 °C; dans ce cas, $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$ g s⁻¹ cm⁻¹ et $\rho_{aq} = 1,0$ g cm³.

Le temps de centrifugation est donné par l'équation 2:

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot \rho^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

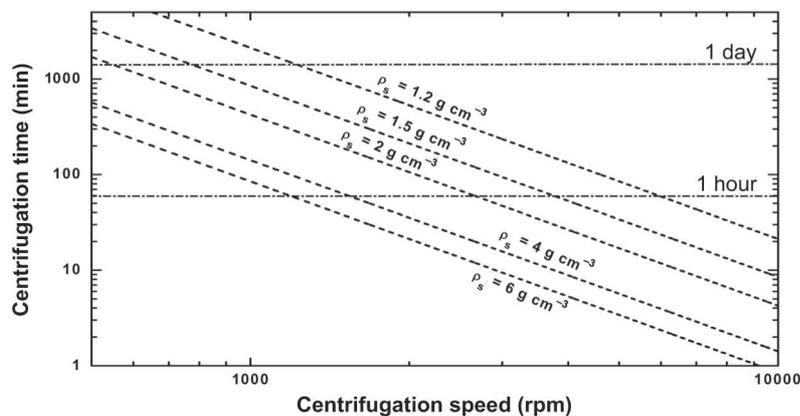
3. L'équation 2 montre l'importance des paramètres du temps (t) et de la vitesse (rpm) pour définir les conditions de centrifugation permettant de séparer des particules d'une taille définie (c'est-à-dire d'un rayon de 0,1 μm dans notre cas): 1) la densité du sol et 2) la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse ($R_b - R_t$), déterminent la distance qu'une particule de sol doit parcourir entre le haut de la solution et la base du tube; il apparaît que, pour un volume fixe, la longueur du mélange dans le tube dépend du carré du rayon du tube.
4. La figure 1 présente les différents temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) pour différentes densités du sol (ρ_s) (figure 1a) et pour différentes longueurs du mélange dans les tubes de la centrifugeuse (figure 2a). La figure 1a montre nettement l'influence de la densité du sol. Pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 240 min pour une densité du sol de 1,2 g cm³, alors qu'il n'est que de 50 min pour 2,0 g cm³. La figure 1b montre d'une manière similaire que, pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 50 min pour un mélange de 10 cm de long et de seulement 7 min pour une longueur de 1 cm. Il convient cependant de trouver un compromis optimal entre un mode de centrifugation exigeant le moins de longueur possible et la séparation commode des phases après la centrifugation.

▼B

5. De plus, lorsque l'on définit les conditions expérimentales de la séparation sol/solution, il importe de considérer l'existence d'une troisième «pseudo-phase», les colloïdes. Ces particules, d'une taille inférieure à $0,2 \mu\text{m}$, peuvent influencer de manière significative le mécanisme d'adsorption d'une substance dans une suspension de sol. Après la centrifugation, réalisée comme cela est décrit ci-dessus, les colloïdes restent dans la phase aqueuse et sont analysés en même temps que celle-ci. On perd donc les informations sur leur impact.

Si le laboratoire dispose d'équipements d'ultracentrifugation ou d'ultrafiltration, il peut étudier plus en détail l'adsorption/désorption d'une substance dans le sol et obtenir des informations sur l'adsorption de la substance sur les colloïdes. Il faut effectuer dans ce cas une ultracentrifugation à 60 000 rpm/min ou une ultrafiltration avec des filtres d'une porosité de 100 000 dalton pour séparer les trois phases, sol, colloïdes, solution. Le protocole d'essai doit être modifié en conséquence afin que les trois phases soient analysées.

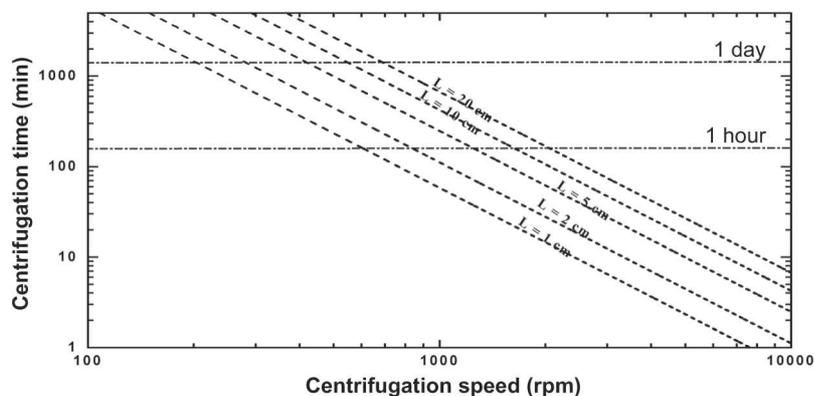
Fig. Ia.



Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la densité du sol.

(ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

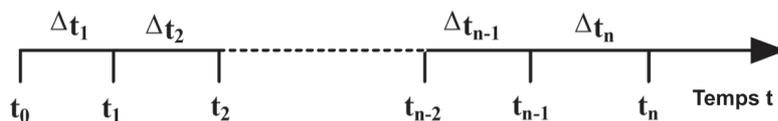
Fig. Ib.



Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse ($R_b - R_t$) = L ; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

▼B*Appendice 5***CALCUL DE L'ADSORPTION A (%) ET DE LA DÉSORPTION D (%)**

Organisation de l'essai dans le temps:



On suppose pour tous les calculs que la substance d'essai est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur les parois du récipient.

ADSORPTION A (A %)a) *Méthode parallèle*

Le pourcentage d'adsorption est calculé pour chaque tube d'essai (i) au temps (t_i) selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \% \quad (1) \text{ (1)}$$

On peut calculer ainsi les termes de l'équation:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \text{ (}\mu\text{g)} \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \text{ (}\mu\text{g)} \quad (3)$$

où

A_{t_i} = pourcentage d'adsorption (%) au temps t_i

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = masse de substance d'essai sur le sol au moment t_i où l'analyse est effectuée (μg)

m_0 = masse de la substance d'essai dans le tube au début de l'essai (μg)

C_0 = concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

(1) Équation applicable à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼ **B**

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps t_i où l'analyse est effectuée ($\mu\text{g cm}^{-3}$); cette concentration est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins

V_0 = volume initial de la solution en contact avec le sol (cm^3).

Les valeurs du pourcentage d'adsorption A_{t_i} ou $C_{aq}^{ads}(t_i)$ sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption (voir les figures 1 et 2).

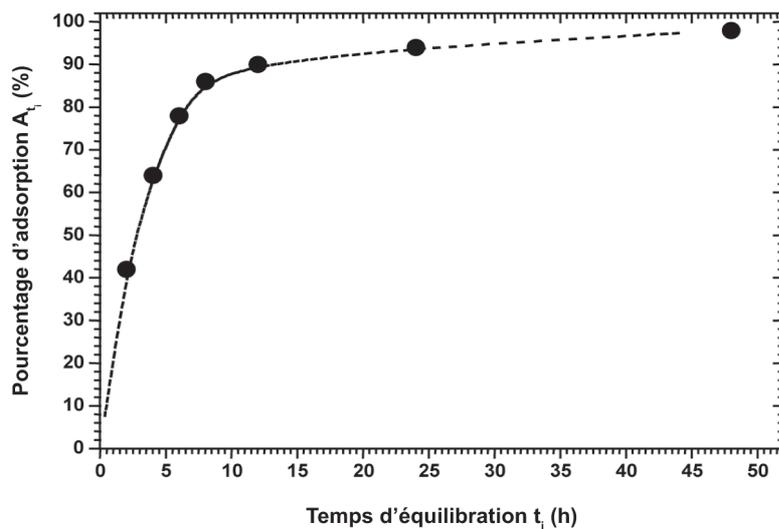


Figure 1.

Courbe de l'équilibre d'adsorption

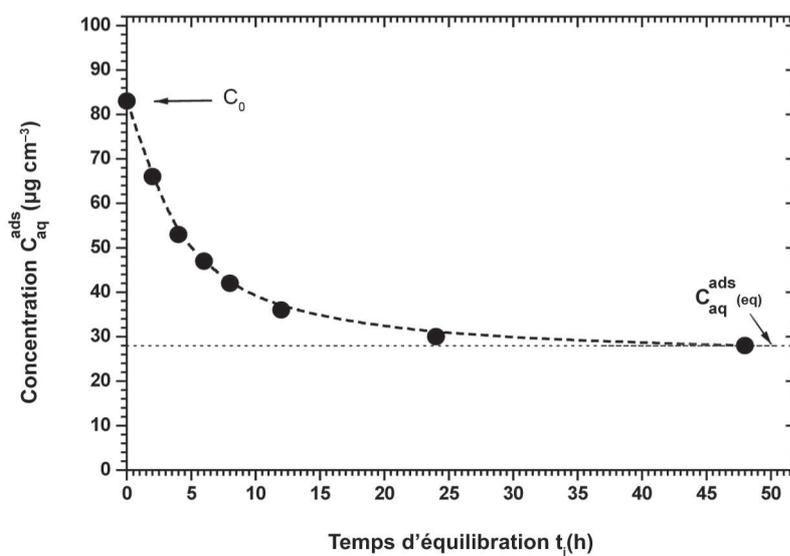


Figure 2.

Concentration massique de la substance d'essai dans la phase aqueuse (C_{aq}) en fonction du temps

▼Bb) *Méthode séquentielle*

Les équations suivantes tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption s'opère en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes de la phase aqueuse à des intervalles de temps précis.

— Durant chaque intervalle de temps, la quantité de substance adsorbée sur le sol est calculée comme suit:

— pour le premier intervalle de temps $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— pour le deuxième intervalle de temps $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— pour le troisième intervalle de temps $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— pour le $n^{\text{ième}}$ intervalle de temps $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— le pourcentage d'adsorption à chaque intervalle de temps $A_{\Delta t_i}$ est calculée selon l'équation suivante:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (8)^{(1)}$$

tandis que le pourcentage d'adsorption (A_{t_i}) au temps t_i est donné par l'équation:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (9)^{(1)}$$

Les valeurs de l'adsorption A_{t_i} or $A_{\Delta t_i}$ (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption.

— Au temps d'équilibre t_{eq} :

— la masse de substance adsorbée sur le sol est égale à:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)^{(1)}$$

⁽¹⁾ Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

— la masse de substance dans la solution est égale à:

$$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11) \text{ (}^1\text{)}$$

— et le pourcentage d'adsorption à l'équilibre est égal à:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12) \text{ (}^1\text{)}$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = masse de substance adsorbée sur le sol durant les intervalles de temps $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg)

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = masse de substance mesurée dans une aliquote V_a^A au temps t_1, t_2, \dots, t_n (μg)

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (μg)

V_a^A = volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée (cm^3)

$A_{\Delta t_i}$ = pourcentage d'adsorption correspondant à l'intervalle de temps Δt_i (%)

A_{eq} = pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

DÉSORPTION D (%)

Le temps t_0 qui marque le début de l'essai de cinétique de désorption correspond au moment où le volume maximal de substance récupérée (une fois que l'équilibre d'adsorption a été atteint) est remplacé par un volume égal de solution de CaCl_2 0,01 M.

a) Méthode parallèle

Au temps t_i , on mesure la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse prélevée dans le tube i (V_i^i) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_i^i} \right) - m_{\text{aq}}^A \quad (13)$$

À l'équilibre de désorption $t_i = t_{\text{eq}}$ de sorte que $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$

La masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps (Δt_i) est donnée par l'équation suivante:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Le pourcentage de désorption est calculé comme suit:

au temps t_i avec l'équation:

(¹) Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (15)$$

durant l'intervalle de temps (Δt_i) avec l'équation:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (16)$$

où:

D_{t_i} = pourcentage de désorption au temps t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = pourcentage de désorption à l'intervalle de temps Δt_i (%)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$ = masse de substance désorbée au temps t_i , (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$ = masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps Δt_i (μg)

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$ = masse de substance mesurée par analyse au temps t_i dans un volume de solution V_r^i prélevé pour l'analyse (μg);

m_{aq}^{A} = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (μg)

V_{R} = volume de surnageant prélevé du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égal de solution de CaCl_2 0,01 M (cm^3)

V_r^i = volume de solution prélevé du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (cm^3).

Les valeurs de désorption D_{t_i} ou $D_{\Delta t_i}$ (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on calcule le temps mis pour atteindre l'équilibre de désorption.

b) *Méthode séquentielle*

Les équations ci-après tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption a été réalisé en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes ((v_a^{A})) de la phase aqueuse (voir le chapitre sur la méthode séquentielle au point 1.9 «Réalisation de l'essai»). On suppose a) que le volume de surnageant prélevé du tube après l'essai de cinétique d'adsorption a été remplacé par un volume égal de solution de CaCl_2 0,01 M (V_{R}) et b) que le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol (V_{T}) durant l'essai de cinétique de désorption reste constant et égal à l'équation suivante:

$$V_{\text{T}} = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

▼B

Au temps t_i :

- La masse de substance est mesurée dans une petite aliquote (v_a^D) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right) \quad (19)$$

- À l'équilibre de désorption $t_i = t_{\text{eq}}$ de sorte que $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$.

- Le pourcentage de désorption D_{t_i} est calculé selon l'équation suivante:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (20)$$

À l'intervalle de temps (Δt_i):

La quantité de substance désorbée durant chaque intervalle de temps est calculée de la manière suivante:

- pour le premier intervalle de temps $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{and} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- pour le deuxième intervalle de temps $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right)$$

et

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - [m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

- pour le nième intervalle de temps $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right] \quad \text{et} \quad (23)$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$$

Enfin, le pourcentage de désorption à chaque intervalle de temps $D_{\Delta t_i}$ est calculé au moyen de l'équation suivante:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (24)$$

tandis que le pourcentage de désorption D_{t_i} à un moment t_i est donné par l'équation ci-dessous:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (25)$$

▼B

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = masse de substance restant adsorbée sur le sol après les intervalles de temps $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = masse de substance désorbée durant les intervalles de temps $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg)

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = masse de substance mesurée dans une aliquote (v_a^D) au temps t_1, t_2, \dots, t_n (μg);

V_T = volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle (cm^3)

m_{aq}^A = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

où:

V_R = volume de surnageant extrait du tube après l'obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égale de solution de CaCl_2 0,01 M (cm^3)

v_a^D = volume d'aliquote extrait du tube (i) pour analyse durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle (cm^3)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

| | Symbole | Unités | Temps d'équili- brage |
|---|---------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Après agitation et centrifugation | | | | | | | | | |
| MÉTHODE INDIRECTE | | | | | | | | | |
| Méthode parallèle | | | | | | | | | |
| Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoins incluse | $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | | | | |
| Méthode séquentielle | | | | | | | | | |
| Masse de substance mesurée dans l'aliquote V_a^A | $m_m^{ads}(t_i)$ | μg | | | | | | | |
| MÉTHODE DIRECTE | | | | | | | | | |
| Masse de substance adsorbée sur le sol | $m_s^{ads}(t_i)$ | μg | | | | | | | |
| Calcul de l'adsorption | | | | | | | | | |
| Adsorption | A_{t_i} | % | | | | | | | |
| | $A_{\Delta t_i}$ | % | | | | | | | |
| Moyennes | | | | | | | | | |
| Coefficient d'adsorption | K_d | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ | | | | | | | |
| Moyennes | | | | | | | | | |
| Coefficient d'adsorption | K_{oc} | $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ | | | | | | | |
| Moyennes | | | | | | | | | |

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): %

Température: °C

Essai d'adsorption: témoins et contrôles

| | Symbole | Unités | Témoin | | Témoin | | Contrôle | |
|--|---------|---------------|--------|---|--------|--|----------|---|
| Tube n° | | | | | | | | |
| Poids du sol | | g | | | | | 0 | 0 |
| Volume d'eau dans le sol pesé (calculé) | | cm^3 | | | | | — | — |
| Volume de solution de CaCl_2 0,01 M ajouté | | cm^3 | | | | | | |
| Volume ajouté de solution de réserve de la substance | | cm^3 | 0 | 0 | | | | |
| Volume total de la phase aqueuse (calculé) | | cm^3 | | | | | — | — |

▼B

| | Symbole | Unités | Témoin | | Témoin | | Contrôle | |
|--|---------|-----------------------|--------|--|--------|--|----------|--|
| Concentration initiale de la substance dans la phase aqueuse | | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | | | |

Après agitation et centrifugation

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|--|--|--|--|--|--|
| Concentration dans la phase aqueuse | | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|--|--|--|--|--|--|

Remarque: ajouter des colonnes si nécessaire.

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): %

Température: °C

Bilan matière

| | Symbole | Unités | | | | |
|---|------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| Tube n° | | | | | | |
| Poids du sol | — | g | | | | |
| Sol: matière sèche | m_{sol} | g | | | | |
| Volume d'eau dans le sol pesé (calculé) | V_{ws} | ml | | | | |
| Volume de CaCl_2 0,01 M pour équilibrer le sol | | ml | | | | |
| Volume de solution de réserve | | cm^3 | | | | |
| Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol | V_0 | cm^3 | | | | |
| Concentration initiale de la solution à tester | C_0 | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | |
| Temps d'équilibrage | — | h | | | | |

Après agitation et centrifugation

| | | | | | | |
|---|---|-----------------------|--|--|--|--|
| Concentration de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption, correction témoin incluse | $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | |
| Temps d'équilibrage | t_{eq} | h | | | | |

1^{re} dilution au solvant

| | | | | | | |
|---------------------------------|------------------|---------------|--|--|--|--|
| Volume extrait de phase aqueuse | V_{rec} | cm^3 | | | | |
| Volume ajouté de solvant | ΔV | cm^3 | | | | |

1^{re} extraction au solvant

| | | | | | | |
|--|-----------------|-----------------------|--|--|--|--|
| Signal analysé dans le solvant | S_{E1} | var. | | | | |
| Concentration de substance dans le solvant | C_{E1} | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | |

▼B

| | Symbole | Unités | | | | | | |
|---|--------------|-----------------------|--|--|--|--|--|--|
| Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient | m_{E1} | μg | | | | | | |
| 2 ^e dilution au solvant | | | | | | | | |
| Volume de solvant extrait | ΔV_S | cm^3 | | | | | | |
| Volume de solvant ajouté | $\Delta V'$ | cm^3 | | | | | | |
| 2 ^e extraction au solvant | | | | | | | | |
| Signal analysé dans le solvant | S_{E2} | var. | | | | | | |
| Concentration de substance dans le solvant | C_{E2} | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | | | |
| Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient | m_{E2} | μg | | | | | | |
| Masse totale de substance: extraction en deux tapes | m_E | μg | | | | | | |
| Bilan matière | MB | % | | | | | | |

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ... %

Température: ... °C

Isothermes d'adsorption

| | Symbole | Unités | | | | | | | |
|--|----------|-----------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| Tube n° | | | | | | | | | |
| Poids du sol | — | g | | | | | | | |
| Sol: matière sèche | E | g | | | | | | | |
| Volume d'eau dans le sol pesé (calculé) | V_{WS} | cm^3 | | | | | | | |
| Volume de CaCl_2 0,01 M pour équilibrer le sol | | cm^3 | | | | | | | |
| Volume de solution de réserve ajouté | | cm^3 | | | | | | | |
| Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol (calculé) | V_0 | cm^3 | | | | | | | |
| Concentration de la solution | C_0 | $\mu\text{g cm}^{-3}$ | | | | | | | |
| Temps d'équilibrage | — | h | | | | | | | |

▼B

| | Symbole | Unités | | | | | | | | |
|--|---------------------|------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Après agitation et centrifugation | | | | | | | | | | |
| Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoin incluse | $C_{aq}^{ads} (eq)$ | $\mu g\ cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Température | | $^{\circ}C$ | | | | | | | | |
| Masse adsorbée par unité de sol | $C_s^{ads} (eq)$ | $\mu g\ g^{-1}$ | | | | | | | | |

Analyse de régression:

valeur de K_F^{ads} :valeur de l/n :coefficient de régression r^2 :

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C 12 h): ... %

Température: ... °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte Parallèle Séquentielle **Essai de désorption**

| | Symbole | Unités | Intervalle de temps | Intervalle de temps | Intervalle de temps | Intervalle de temps |
|---|------------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Tube n° provenant de l'essai d'adsorption | | | | | | |
| Masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption | $m_s^{ads} (eq)$ | μg | | | | |
| Volume extrait de phase aqueuse remplacé par $CaCl_2$ 0,01 M | V_R | cm^3 | | | | |
| Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol | PM | V_0 | cm^3 | | | |
| | SM | V_T | cm^3 | | | |
| Masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant | m_{aq}^A | μg | | | | |

Cinétique de désorption

| | | | | | | |
|--|-----------------------------|---------|--------|--|--|--|
| Masse mesurée de substance désorbée du sol au temps t_i | $m_m^{des} (t_i)$ | μg | | | | |
| Volume de solution extrait du tube (i) afin | PM | V_f^i | cm^3 | | | |
| | SM | V_a^D | cm^3 | | | |
| Masse de substance désorbée du sol au temps t_i (calculé) | $m_{aq}^{des} (t_i)$ | μg | | | | |
| Masse de substance désorbée du sol durant l'intervalle de temps Δt_i (calculé) | $m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$ | μg | | | | |

▼B

| | Symbole | Unités | Intervalle de temps | Intervalle de temps | Intervalle de temps | Intervalle de temps |
|---|------------------|--------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Pourcentage de désorption | | | | | | |
| Désorption au temps t_i | D_{t_i} | % | | | | |
| Désorption à l'intervalle de temps Δt_i | $D_{\Delta t_i}$ | % | | | | |
| Coefficient de désorption apparente | K_{des} | | | | | |

PM: Méthode parallèle.

SM: Méthode séquentielle.

▼B

C.19. **ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION (K_{oc}) SUR LE SOL ET LES BOUES D'ÉPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite reprend la ligne directrice n° 121 de l'OCDE (2001).

1.1. **INTRODUCTION**

On peut décrire le comportement de sorption des substances dans les sols ou les boues d'épuration à l'aide de paramètres déterminés expérimentalement selon la méthode d'essai C18. Un des paramètres essentiels est le coefficient d'adsorption, défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans le sol ou les boues et sa concentration dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption. Le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique du sol (K_{oc}) est un bon indicateur de la capacité de liaison d'une substance chimique à la matière organique du sol ou des boues d'épuration, et permet de comparer les substances chimiques entre elles. On peut estimer ce paramètre à partir de corrélations entre la solubilité dans l'eau et le coefficient de partage n-octanol/eau (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

La méthode expérimentale décrite dans cet essai utilise la HPLC pour estimer le coefficient d'adsorption K_{oc} dans le sol ou les boues d'épuration (8). Elle donne des résultats beaucoup plus fiables que ceux obtenus par les calculs de la méthode QSAR (9). En tant que méthode d'estimation, elle ne peut pas être totalement substituée aux essais par agitation conduits dans le cadre de la méthode d'essai C.18. Toutefois, le K_{oc} estimé peut servir à sélectionner des paramètres d'essai pertinents pour l'étude des processus d'adsorption/désorption suivant la méthode précitée, grâce au calcul du coefficient de distribution (K_d) ou du coefficient d'adsorption de Freundlich (K_f) selon l'équation 3 (voir paragraphe 1.2).

1.2. **DÉFINITIONS**

K_d est le coefficient de distribution défini comme le rapport des concentrations à l'équilibre (C) d'une substance d'essai dissoute dans un système à deux phases dont une sorbante (sol ou boues d'épuration) et l'autre aqueuse. Il est sans unité lorsque les concentrations dans les deux phases sont exprimées en termes de poids par poids. Si la concentration dans la phase aqueuse est exprimée en poids par volume, les unités sont alors en $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$. K_d est susceptible de varier en fonction des propriétés du sorbant et peut dépendre de la concentration.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ OR } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

où:

C_{soil} = est la concentration de la substance d'essai dans le sol à l'équilibre d'adsorption ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$);

C_{slud} = est la concentration de la substance d'essai dans les boues à l'équilibre d'adsorption ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$);

C_{aq} = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

▼B

K_f est le coefficient d'adsorption de Freundlich, défini comme la concentration de la substance d'essai dans le sol ou les boues d'épuration (x/m) lorsque la concentration à l'équilibre (C_{aq}) dans la phase aqueuse est égale à un. Il est exprimé en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sorbant. Il se calcule selon l'équation suivante.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

où:

x/m = est la quantité de sorbant;

$1/n$ = est la pente de l'isotherme d'adsorption de Freundlich;

C_{aq} = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Lorsque $C_{aq} = 1$; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc} est le coefficient de distribution (K_d) ou le coefficient d'adsorption de Freundlich (K_f) normalisé basé sur la teneur en carbone organique (f_{oc}) du sorbant. Plus particulièrement dans le cas des substances non ionisées, il donne une approximation du degré d'adsorption d'une substance sur le sorbant et permet de faire des comparaisons entre différents produits chimiques. Dépendant de K_d et de K_f , il peut être sans unité ou s'exprimer en $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ ou en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière organique.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (sans unité ou en } \text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\text{) ou } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Comme la relation entre K_{oc} et K_d n'est pas toujours linéaire, les valeurs de K_{oc} peuvent donc varier d'un sol à l'autre, mais leur variabilité est très réduite par rapport aux valeurs de K_d ou de K_f .

Le coefficient d'adsorption (K_{oc}) se déduit du facteur de capacité (k') à partir de la courbe d'étalonnage de $\log k'$ en fonction de $\log K_{oc}$, tracée pour les composés de référence sélectionnés. L'équation est la suivante:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

où:

t_R = est le temps de rétention de la substance d'essai et de la substance de référence dans la colonne de HPLC (en minutes)

t_0 = est le temps mort dans la colonne de HPLC (en minutes) (voir point 1.8.2).

P_{ow} est le coefficient de partage octanol/eau, défini comme le rapport des concentrations d'une substance dissoute dans l'eau et le n-octanol. Il est sans dimension.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

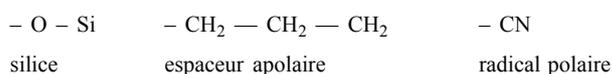
Avant d'utiliser cette méthode, il convient de connaître la formule développée, la pureté et, le cas échéant, la constante de dissociation des substances de référence. Il est également utile d'être renseigné sur leur solubilité dans l'eau et les solvants organiques, leur coefficient de partage octanol/eau ainsi que sur leurs caractéristiques d'hydrolyse.

▼B

Pour établir la corrélation entre les résultats expérimentaux de rétention en HPLC d'une substance d'essai et son coefficient d'adsorption K_{oc} , on doit tracer la courbe d'étalonnage de $\log K_{oc}$ en fonction de $\log k'$. Il faudrait utiliser au minimum six points dont au moins un supérieur et un inférieur à la valeur supposée de la substance d'essai. La précision de la méthode sera d'autant plus grande que les substances de référence employées présenteront une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai. S'il n'est pas possible d'avoir ces données, l'utilisateur est libre de sélectionner les substances d'étalonnage les mieux adaptées. Il devrait alors opter pour une série plus générale de substances présentant une hétérogénéité de structure. Les substances et les valeurs de K_{oc} recommandées à l'usage sont indiquées en annexe, au tableau 1 pour les boues d'épuration et au tableau 3 pour les sols. Il y aura donc lieu de justifier le choix de toute autre substance d'étalonnage.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La HPLC est réalisée sur des colonnes d'analyse dont la phase solide est composée de résines commerciales cyanopropyliques contenant des radicaux lipophiles et polaires. On utilise une phase stationnaire modérément polaire basée sur une matrice de silice:



Le principe de cette méthode d'essai est analogue à celui de la méthode d'essai A.8 (coefficient de partage, méthode par HPLC). La substance d'essai, en migrant dans la colonne contenant la phase mobile, interagit avec la phase stationnaire. La répartition de la substance entre la phase mobile et la phase stationnaire contribue à en ralentir la progression. La composition de la phase stationnaire qui comporte à la fois des sites polaires et apolaires fait qu'une interaction est possible entre groupements polaires et radicaux apolaires d'une molécule — à l'instar de la matière organique dans des matrices de sol ou de boues d'épuration. On peut ainsi établir une relation entre le temps de rétention sur la colonne et le coefficient d'adsorption sur la matière organique.

Le pH exerce une influence significative, en particulier, sur le comportement de sorption des substances polaires. En règle générale, le pH varie entre 5,5 et 7,5 dans les sols agricoles et les bassins des stations de traitement des eaux usées. Les substances ionisables devraient être testées deux fois dans des solutions tampons appropriées, à savoir sous leur forme ionisée et non ionisée, mais seulement si la dissociation du composé chimique atteint au moins 10 %, à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5.

Comme l'évaluation se fonde exclusivement sur la relation entre la rétention sur la colonne de HPLC et le coefficient d'adsorption, il est inutile de faire appel à une méthode d'analyse quantitative, car seule la détermination du temps de rétention est nécessaire. À condition de disposer d'une série de substances de référence appropriées et d'appliquer des conditions expérimentales normalisées, cette méthode constitue un moyen rapide et efficace d'estimer le coefficient d'adsorption K_{oc} .

1.5. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode par HPLC convient aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe un système de détection approprié (spectrophotomètre ou détecteur de radioactivité, par exemple) et qui restent suffisamment stables tout au long de l'essai. Elle peut s'avérer particulièrement utile pour les substances difficiles à étudier dans d'autres systèmes expérimentaux (à savoir, les substances volatiles, les substances insolubles dans l'eau à une concentration mesurable par analyse et les substances présentant une très grande affinité avec la surface des récipients d'incubation). On peut également l'appliquer à des mélanges qui donnent des bandes d'élution non résolues. Dans ce cas, il faut déterminer les valeurs limites supérieures et inférieures du $\log K_{oc}$ des composants du mélange d'essai.

▼B

Les impuretés risquent parfois de compliquer l'interprétation des résultats de la HPLC, mais leur importance restera négligeable si la substance d'essai peut être clairement identifiée et séparée des impuretés par une méthode analytique.

Après avoir été validée pour les substances énumérées au tableau 1 de l'appendice, cette méthode a été appliquée à toute une série d'autres composés chimiques répertoriés dans les classes chimiques suivantes:

- amines aromatiques (exemples: trifluraline, 4-chloroaniline, 3,5-dinitro-aniline, 4-méthylaniline, N-méthyl-aniline, 1-naphthylamine),
- esters d'acides carboxyliques aromatiques (exemples: ester méthylique de l'acide benzoïque, 3,5-dinitrobenzoate d'éthyle),
- hydrocarbures aromatiques (exemples: toluène, xylène, éthylbenzène, nitrobenzène),
- esters de l'acide aryloxyphénoxypropionique (exemples: didofop-méthyle, fénoxaprop-éthyle, fénoxaprop-P-éthyle).
- fongicides à base de benzimidazole ou d'imidazole (exemples: carbendazime, fubéridazole, triazoxyde),
- amides de l'acide carboxilique (exemples: 2-chlorobenzamide, N,N-diméthylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-méthylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide),
- hydrocarbures chlorés (exemples: endosulfan, DDT, hexachlorobenzène, quintozone, 1,2,3-trichlorobenzène),
- insecticides organo-phosphorés (exemples: azinphos-méthyle, disulfoton, phénamiphos, isophenphos, pyrazophos, sulprophos, triazophos),
- phénols (exemples: phénol, 2-nitrophénol, 4-nitrophénol, pentachlorophénol, trichloro-2,4,6-phénol, 1-naphtol),
- dérivés de la phénylurée (exemples: isoproturon, monolinuron, pencycuron),
- colorants pigmentaires (exemples: Acid yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),
- hydrocarbures aromatiques polycycliques (exemples: acénaphthène, naphthalène),
- herbicides à base de triazine-1,3,5 (exemples: prométryne, propazine, simazine, terbutryne),
- dérivés de triazole (exemples: tébuconazole, triadiméfon, triadiméfol, triapenthénol).

Cette méthode ne convient pas aux substances réagissant avec l'éluant ou la phase stationnaire. Par ailleurs, elle n'est pas applicable aux substances qui interagissent de manière spécifique avec des constituants inorganiques (formation de complexes en grappe avec les minéraux argileux, par exemple). Elle risque d'être inopérante pour les produits tensio-actifs, les substances inorganiques ainsi que les acides et bases modérés à forts. Elle permet de déterminer des valeurs de $\log K_{oc}$ comprises entre 1,5 et 5,0. Les substances ionisantes doivent être mesurées dans une phase mobile tamponnée, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la précipitation des composants du tampon ou de la substance d'essai.

▼B

1.6. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.6.1. **Précision**

En règle générale, le coefficient d'adsorption d'une substance d'essai peut être estimé à $\pm 0,5$ unité logarithmiques de la valeur déterminée d'après la méthode par agitation (voir au tableau 1 de l'appendice). Il est possible d'atteindre une plus grande précision si les substances de référence utilisées présentent une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai.

1.6.2. **Répétabilité**

Toutes les analyses doivent être répétées au moins deux fois. Les valeurs du $\log K_{oc}$ calculées à partir de résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unité log.

1.6.3. **Reproductibilité**

L'expérience acquise jusqu'à présent en appliquant la méthode d'essai par HPLC vient en corroborer la validité. À l'issue d'une étude expérimentant 48 substances (en majorité des pesticides) pour lesquelles existaient des données fiables concernant le K_{oc} sur des sols, on a obtenu un coefficient de corrélation: $R = 0,95$ (10) (11).

Un essai comparatif interlaboratoires conduit par 11 laboratoires a permis d'améliorer et de valider la méthode (12). Tous les résultats sont reproduits au tableau 2 de l'appendice.

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. **Estimation préliminaire du coefficient d'adsorption**

Le coefficient de partage octanol/eau P_{ow} ($= K_{ow}$) et, dans une certaine mesure, l'hydrosolubilité peuvent servir d'indicateurs du degré d'adsorption, en particulier, pour les substances non ionisées. Ils permettent donc une première approximation des ordres de grandeur. Une série de corrélations utiles ont été publiées concernant plusieurs classes de produits chimiques (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Appareillage**

L'appareillage doit nécessairement comprendre un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe sans pulsations et d'un système de détection adapté. Il est recommandé d'utiliser une boucle d'injection munie d'une valve d'injection. Il faut employer des résines commerciales cyanopropyliques liées chimiquement sur une base de silice (Hypersil ou Zorbax CN, par exemple). Une colonne de garde du même matériau peut être insérée entre le système d'injection et la colonne d'analyse. La puissance de séparation des colonnes d'analyse est susceptible de varier énormément d'un fournisseur à l'autre. À titre indicatif, il faudrait atteindre les facteurs de capacité (k') suivants: $\log k' > 0,0$ pour $\log K_{oc} = 3,0$ et $\log k' > -0,4$ pour $\log K_{oc} = 2,0$, en utilisant une phase mobile méthanol/eau 55/45 %.

1.7.3. **Phases mobiles**

Après avoir testé différentes phases mobiles, on recommande les deux suivantes:

— méthanol/eau (55/45 % v/v),

— méthanol/solution tampon de citrate 0,01 M à pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Le solvant d'élution est préparé à partir de méthanol de qualité HPLC et d'eau distillée ou d'un tampon citrate. Le mélange est dégazé avant emploi. Il est préférable d'effectuer une élution isocratique. Si les mélanges méthanol/eau sont contre-indiqués, on peut essayer d'autres mélanges de solvant organique/eau, à savoir éthanol/eau ou acétonitrile/eau. Dans le cas de composés ionisants, il est recommandé d'utiliser une solution tampon afin de stabiliser le pH. Il faut veiller à éviter que les sels ne précipitent ou que la colonne ne se détériore, ce qui risque de se produire avec certains mélanges de phase organique/tampon.

On s'abstiendra d'utiliser des additifs tels que des réactifs à paires d'ions, car ils risquent d'affecter les propriétés sorbantes de la phase stationnaire. Vu que des modifications de cette nature dans la phase stationnaire risquent d'être irréversibles, il est impératif d'effectuer les analyses comportant ce type d'additifs sur des colonnes séparées.

1.7.4. Solutés

Les substances de référence et d'essai doivent être dissoutes dans la phase mobile.

1.8. RÉALISATION DE L'ESSAI**1.8.1. Conditions expérimentales**

On doit enregistrer la température pendant les mesures. Il est fortement recommandé d'utiliser une colonne placée dans une enceinte thermostaturée afin de garantir des conditions de température constantes pendant les différents cycles d'étalonnage et d'évaluation et la mesure de la substance d'essai.

1.8.2. Détermination du temps mort t_0

On peut utiliser deux méthodes pour déterminer le temps mort t_0 (voir également point 1.2).

1.8.2.1. Détermination du temps mort t_0 au moyen d'une série homologue

Cette procédure a montré qu'il est possible d'obtenir des valeurs de t_0 harmonisées et fiables. Pour sa description, il faut se reporter à la méthode d'essai A.8 «Coefficient de partage n-octanol/eau et méthode d'analyse par HPLC».

1.8.2.2. Détermination du temps mort t_0 par des substances inertes non retenues sur la colonne

Cette technique met en jeu l'injection de solutions de formamide, d'urée ou de nitrate de sodium. Il convient de répéter les mesures au moins deux fois.

1.8.3. Détermination des temps de rétention t_R

Les substances de référence doivent être sélectionnées selon les indications du point 1.3. Pour déterminer leur temps de rétention, on peut les injecter sous la forme d'un étalon composite, à condition d'avoir vérifié au préalable que le temps de rétention de chaque étalon n'est pas influencé par la présence des autres étalons de référence. Il faudrait procéder à un étalonnage à intervalles réguliers, au moins deux fois par jour, pour tenir compte de toute variation imprévue dans le fonctionnement de la colonne. Pour la bonne règle, il est préférable d'injecter les étalons avant et après la substance d'essai pour s'assurer que les temps de rétention n'ont pas évolué. On injecte chaque substance d'essai séparément dans des proportions aussi faibles que possible (ce qui évite de surcharger la colonne), puis on détermine son temps de rétention.

▼B

Afin d'accroître la fiabilité des mesures, toutes les déterminations doivent être effectuées au moins en double. Les valeurs de $\log K_{oc}$ déduites des résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unité log.

1.8.4. Évaluation

Les facteurs de capacité k' sont calculés à partir du temps mort t_0 et des temps de rétention t_R des substances de référence selon l'équation 4 (voir point 1.2). Les valeurs de $\log k'$ des substances de référence sont ensuite portées sur une courbe graphique en fonction des valeurs de leur $\log K_{oc}$ extraites des essais par agitation dont les résultats figurent aux tableaux 1 et 3 de l'appendice. À l'aide de cette courbe, la valeur du $\log K_{oc}$ d'une substance d'essai est calculée à partir de son $\log k'$. Si les résultats expérimentaux montrent que le $\log K_{oc}$ de la substance sort de l'intervalle des valeurs d'étalonnage, il convient de recommencer l'essai en employant d'autres substances de référence plus appropriées.

2. PRÉSENTATION DES DONNÉES

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

- identité, degré de pureté et, le cas échéant, valeurs de pK_d des substances d'essai et de référence.
- description des matériels utilisés et des conditions expérimentales, en indiquant le type et les dimensions de la colonne d'analyse (et de la colonne de garde), du dispositif de détection, de la phase mobile (rapport des composants et pH), de la plage des températures pendant les mesures,
- temps mort et méthode appliquée pour l'évaluer,
- quantités de substances de référence et d'essai injectées dans la colonne,
- temps de rétention des composés de référence employés pour l'étalonnage,
- détails de la courbe de régression ajustée ($\log k'$ en fonction de $\log K_{oc}$) et représentation graphique de cette courbe,
- valeurs moyennes de rétention et valeur estimée du $\log K_{oc}$ de la substance d'essai,
- chromatogrammes.

3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. *Chemosphere*, 17, 1-67.
- (3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *J. Agric. Food Chem.*, 29, pp. 1050-1059.
- (4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environ. Sci. Technol.*, 17, pp. 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. *J. Environm. Sci. Health*, B19, pp. 297-312.

▼B

- (6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, pp. 831-832.
- (7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, pp. 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35-(1/2), pp. 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), pp. 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, pp. 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), pp. 1373-1384.



Appendice

Tableau 1

Comparaison entre les valeurs de K_{oc} sur les sols et les boues d'épuration et les valeurs calculées suivant la méthode de sélection par HPLC ⁽¹⁾ ⁽²⁾

| Type de substance | N° CAS | Log K_{oc} pour boues d'épuration | Lo Log K_{oc} par HPLC | Δ | Log Log K_{oc} pour sols | Lo Log K_{oc} par HPLC | Δ |
|---------------------|-----------|---|-----------------------------|----------|----------------------------------|-----------------------------|----------|
| Atrazine | 1912-24-9 | 1,66 | 2,14 | 0,48 | 1,81 | 2,20 | 0,39 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,43 | 2,96 | 0,53 | 2,59 | 2,89 | 0,30 |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,75 | 3,58 | 0,17 | 3,31 | 3,40 | 0,09 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,46 | 2,21 | 0,75 | 1,99 | 2,26 | 0,27 |
| Phénanthrène | 85-01-8 | 4,35 | 3,72 | 0,63 | 4,09 | 3,52 | 0,57 |
| Benzoate de phényle | 93-99-2 | 3,26 | 3,03 | 0,23 | 2,87 | 2,94 | 0,07 |
| Benzamide | 55-21-0 | 1,60 | 1,00 | 0,60 | 1,26 | 1,25 | 0,01 |
| 4-Nitrobenzamide | 619-80-7 | 1,52 | 1,49 | 0,03 | 1,93 | 1,66 | 0,27 |
| Acétanilide | 103-84-4 | 1,52 | 1,53 | 0,01 | 1,26 | 1,69 | 0,08 |
| Aniline | 62-53-3 | 1,74 | 1,47 | 0,27 | 2,07 | 1,64 | 0,43 |
| 2,5-Dichloroaniline | 95-82-9 | 2,45 | 2,59 | 0,14 | 2,55 | 2,58 | 0,03 |

⁽¹⁾ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 121-128.

⁽²⁾ W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Tableau 2

Résultats des essais comparatifs inter-laboratoires (11 laboratoires participants) en vue d'améliorer et de valider la méthode par HPLC ⁽¹⁾

| Type de substance | N° CAS | Log K_{oc} | | Log K_{oc} |
|-------------------|------------|--------------|------------|--------------------|
| | | (OCDE 106) | | [Méthode par HPLC] |
| Atrazine | 1912-24-9 | 1,81 | 78 ± 16 | 1,89 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,99 | 100 ± 8 | 2,00 |
| Triapenthénol | 77608-88-3 | 2,37 | 292 ± 58 | 2,47 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 465 ± 62 | 2,67 |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,31 | 2062 ± 648 | 3,31 |

⁽¹⁾ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30 (7), pp. 1373-1384.



Tableau 3

Substances de référence recommandées pour des essais de sélection par HPLC d'après des données relatives à l'adsorption sur les sols

| Substance de référence | N° CAS | Valeurs moyennes de log K_{oc} d'après la méthode par agitation | Nombre de résultats pour le K_{oc} | Écart type du log | Source |
|------------------------|--------------|---|--------------------------------------|-------------------|--------|
| Acétanilide | 103-84-4 | 1,25 | 4 | 0,48 | (a) |
| Phénol | 108-95-2 | 1,32 | 4 | 0,70 | (a) |
| 2-Nitrobenzamide | 610-15-1 | 1,45 | 3 | 0,90 | (b) |
| N.N-diméthylbenzamide | 611-74-5 | 1,52 | 2 | 0,45 | (a) |
| 4-Méthylbenzamide | 619-55-6 | 1,78 | 3 | 1,76 | (a) |
| Benzoate de méthyle | 93-58-3 | 1,80 | 4 | 1,08 | (a) |
| Atrazine | 1912-24-9 | 1,81 | 3 | 1,08 | (c) |
| Isoproturon | 34123-59-6 | 1,86 | 5 | 1,53 | (c) |
| 3-Nitrobenzamide | 645-09-0 | 1,95 | 3 | 1,31 | (b) |
| Aniline | 62-53-3 | 2,07 | 4 | 1,73 | (a) |
| 3,5-Dinitrobenzamide | 121-81-3 | 2,31 | 3 | 1,27 | (b) |
| Carbendazime | 10605-21-7 | 2,35 | 3 | 1,37 | (c) |
| Triadiménol | 55219-65-3 | 2,40 | 3 | 1,85 | (c) |
| Triazoxyde | 72459-58-6 | 2,44 | 3 | 1,66 | (c) |
| Triazophos | 24017-47-8 | 2,55 | 3 | 1,78 | (c) |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 3 | 1,97 | (c) |
| Naphtalène | 91-20-3 | 2,75 | 4 | 2,20 | (a) |
| Endosulfane-diol | 2157-19-9 | 3,02 | 5 | 2,29 | (c) |
| Méthiocarbe | 2032-65-7 | 3,10 | 4 | 2,39 | (c) |
| Acid Yellow 219 | 63405-85-6 | 3,16 | 4 | 2,83 | (a) |
| 1,2,3-Trichlorobenzène | 87-61-6 | 3,16 | 4 | 1,40 | (a) |
| γ -HCH | 58-89-9 | 3,23 | 5 | 2,94 | (a) |
| Fenchion | 55-38-9 | 3,31 | 3 | 2,49 | (c) |
| Direct Red 8 1 | 2610-11-9 | 3,43 | 4 | 2,68 | (a) |
| Pyrazophos | 13457-18-6 | 3,65 | 3 | 2,70 | (c) |
| α -Endosulfane | 959-98-8 | 4,09 | 5 | 3,74 | (c) |
| Diclofop-méthyle | i 51338-27-3 | 4,20 | 3 | 3,77 | (c) |
| Phénanthrène | 85-01-8 | 4,09 | 4 | 3,83 | (a) |
| Basic Blue 41 (mix) | 26850-47-5 | 4,89 | 4 | 4,46 | (a) |
| | 12270-13-2 | | | | |
| DDT | 50-29-3 | 5,63 | 1 | | (b) |

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(c) Données communiquées par les industriels.

«C.20 *Daphnia magna*, essai de reproduction

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 211(2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour intégrer les progrès de la science. La ligne directrice 211 a pour origine la ligne directrice 202 — Partie II: «*Daphnia* sp., essai de reproduction» (1984). Il était généralement admis que les résultats obtenus au cours d'essais pratiqués selon la ligne directrice 202 pouvaient être variables. De ce fait, des efforts considérables ont été déployés pour découvrir les raisons de cette variabilité, en vue de mettre au point une meilleure méthode d'essai. La ligne directrice 211 est le fruit des activités de recherche, des essais interlaboratoires et des études de validation réalisés en 1992 (1), 1994 (2) et 2008 (3).

Les principales différences entre la version initiale (ligne directrice 202, 1984) et la deuxième version (ligne directrice 211, 1998) de la ligne directrice sont les suivantes:

- l'espèce recommandée est *Daphnia magna*;
- la durée de l'essai est de 21 jours;
- pour les essais semi-statiques, le nombre d'animaux à utiliser pour chaque concentration d'essai a été réduit: il est passé d'au moins 40, répartis de préférence en quatre groupes de 10 animaux, à au moins 10 animaux traités individuellement (mais différents modes opératoires peuvent être appliqués pour les essais en écoulement continu);

- des recommandations plus spécifiques ont été formulées quant au milieu d'essai et aux conditions d'alimentation.
- Les principales différences entre la deuxième version de la ligne directrice (211, 1998) et la version actuelle sont les suivantes:
- l'appendice 7 a été ajouté pour décrire les procédures permettant l'identification du sexe des descendants si cela est requis. Conformément aux versions précédentes de cette méthode d'essai, l'identification du sexe des descendants est une observation optionnelle;
- la variable de réponse exprimée par le nombre de descendants vivants par animal parent survivant a été complétée par une variable de réponse supplémentaire correspondant à la reproduction de *Daphnia*, à savoir le nombre total de descendants vivants produits à la fin de l'essai par organisme parent présent au début de l'essai, en excluant de l'analyse la mortalité parentale aléatoire (accidentelle et/ou fortuite). Cette variable de réponse est ajoutée à des fins d'harmonisation de ce paramètre avec les autres méthodes d'essai de reproduction chez les invertébrés. En outre, la présente méthode d'essai permet d'éliminer une source d'erreur sur cette variable, à savoir l'effet de la mortalité parentale fortuite et/ou accidentelle éventuellement observée pendant la période d'exposition.
- D'autres indications statistiques portant sur la conception de l'essai et le traitement des résultats ont été ajoutées, tant pour la CE_x (p. ex. CE_{10} ou CE_{50}) que pour l'approche fondée sur la CSEO/CMEO.
- Un essai limite a été introduit.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Le principal objectif de l'essai consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur le taux de reproduction de *Daphnia magna*. Pour ce faire, de jeunes femelles de *Daphnia* (les animaux parents), âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées au produit chimique d'essai ajouté à l'eau à différentes concentrations. L'essai dure 21 jours. À la fin de l'essai, le nombre total de descendants vivants produits est évalué. Le taux de reproduction des animaux parents peut s'exprimer autrement (p. ex. par le nombre de descendants vivants engendrés par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés), mais ces résultats sont fournis en plus du nombre total de descendants vivants produits à la fin de l'essai. Du fait du mode opératoire particulier des essais semi-statiques par rapport aux autres méthodes d'essai sur la reproduction des invertébrés, il est également possible de compter le nombre de descendants vivants produits individuellement par chaque animal parent. Ainsi, contrairement aux autres méthodes d'essais sur la reproduction des invertébrés, on peut exclure de l'analyse les données correspondant aux descendants d'un animal parent décédé de manière accidentelle et/ou fortuite pendant l'exposition. En l'occurrence, si une mortalité parentale se produit dans les réplicats exposés à la substance d'essai, il convient d'analyser si cette mortalité suit une courbe concentration-réponse, par exemple s'il existe une régression significative de la réponse par rapport à la concentration testée du produit chimique d'essai, avec une pente positive (un test statistique tel que le test de tendance de Cochran-Armitage peut être utilisé à cet effet). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les réplicats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité parentale suit une courbe de concentration-réponse, cette mortalité est assimilée à un effet du produit chimique testé et les réplicats ne sont pas exclus de l'analyse des résultats. Si le parent meurt au cours de l'essai de manière accidentelle ou fortuite non liée au produit chimique testé, ou se révèle être un parent de sexe masculin, alors le réplicat est exclu de l'analyse des résultats (voir paragraphe 51). L'effet toxique du produit chimique d'essai sur le taux de reproduction est mesuré par la CE_x , les données étant ajustées à un modèle approprié au moyen d'une régression non linéaire en vue d'estimer la concentration qui entraînerait x % de réduction du taux de reproduction, respectivement, ou encore par celle de la CSEO/CMEO (4). Il est préférable que les concentrations d'essai encadrent la concentration efficace minimale (p. ex. CE_{10}), de sorte que cette valeur soit déterminée par interpolation et non par extrapolation.

Il convient aussi d'indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première portée. D'autres effets liés au produit chimique sur des paramètres tels que la croissance (p. ex. la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés (voir paragraphe 44).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

Les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir chapitre C.2 de la présente annexe *Daphnia* sp., essai d'immobilisation immédiate) réalisé sur *Daphnia magna* peuvent être utiles pour sélectionner une gamme de concentrations d'essai adaptée aux essais de reproduction. Il convient que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur du produit chimique d'essai soient connues. De même, il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser le produit chimique dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus.

Des informations sur le produit chimique d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté du produit chimique, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage P_{oc} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate [voir les chapitres C.4 (détermination de la biodégradabilité facile) et C.29 (Biodégradabilité facile — dégagement de CO₂ dans des flacons hermétiquement clos) de la présente annexe.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valide, il convient que les témoins remplissent les critères de performance suivants:

- la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai;
- le nombre moyen de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai est ≥ 60 .

Note: Le même critère de validité (20 %) peut s'appliquer pour la mortalité parentale aléatoire ou accidentelle chez les témoins ainsi que pour chacune des concentrations d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai sont intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. On utilisera en principe des béciers en verre.

En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant:

- appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume);
- appareillage adéquat pour maintenir la température constante;
- pH-mètre;
- appareil pour mesurer la dureté de l'eau;
- appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO);
- dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.

Organisme d'essai

L'espèce à utiliser dans cet essai est *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

Le clone devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. La recherche (1) a montré que la capacité reproductrice du clone A (originaire de l'IRCHA, en France) (5) répond de façon stable au critère de validité qui stipule une moyenne ≥ 60 descendants vivants par animal parent survivant lorsqu'il est élevé dans les conditions que décrit la présente méthode d'essai. D'autres clones sont toutefois acceptables à condition de prouver que la culture de *Daphnia* remplit les critères de validité pour l'essai.

⁽¹⁾ On peut faire appel à d'autres espèces de *Daphnia* à condition qu'elles respectent les critères de validité pertinents (le critère relatif au taux de reproduction des témoins s'applique aux espèces de *Daphnia*). Si d'autres espèces de *Daphnia* sont employées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier leur utilisation.

Au début de l'essai, les animaux sont âgés de moins de 24 heures et ne peuvent pas provenir d'une première génération de descendants. Ils sont issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Le lot d'animaux est maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les *Daphnia*, il convient de laisser aux *Daphnia* une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure habituellement trois semaines environ (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

Milieu d'essai

Il est recommandé d'utiliser un milieu entièrement défini dans cet essai. On peut ainsi éviter d'employer des additifs (p. ex. des algues, des extraits de sol), qui sont difficiles à caractériser, et améliorer les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elendt M4 (6) et M7 (voir appendice 2) se sont révélés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables [par exemple (7) et (8)], à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci seront spécifiés clairement et le rapport d'essai devra comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est conseillé de maintenir les niveaux de COT dans le milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) inférieurs à 2 mg/l (9).

Lorsque l'on teste des produits chimiques contenant des métaux, il est important de reconnaître que les propriétés du milieu d'essai (p. ex. la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent influencer leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *Daphnia magna* sont Elendt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélatant EDTA. Des travaux ont montré (2) que la «toxicité apparente» du cadmium est généralement moindre lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7, que dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour tester des produits chimiques contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélatants connus. Il est souhaitable d'utiliser un autre milieu pour les produits chimiques renfermant des métaux, par exemple l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (9), qui ne contient pas d'EDTA. La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues (10) convient également aux cultures à long terme de *Daphnia magna* (2).

La concentration de l'oxygène dissous est supérieure à 3 mg/L au début de l'essai et durant celui-ci. Le pH est compris entre 6 et 9 et normalement ne pas varier de plus de 1,5 unité au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (en CaCO₃) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est révélée conforme aux critères de validité (11) (12).

Solutions d'essai

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Idéalement, les solutions mères sont préparées sans solvants ni dispersants, dans la mesure du possible, en mélangeant ou en agitant le produit chimique d'essai dans le milieu d'essai par des moyens mécaniques comme l'agitation ou le traitement aux ultrasons, ou d'autres méthodes appropriées. Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations du produit chimique d'essai qui seront employées dans l'étude, aussi longtemps que nécessaire pour démontrer que l'on peut maintenir des concentrations d'exposition stables avant d'introduire les organismes d'essai. Si le produit chimique d'essai est difficile à dissoudre dans l'eau, il convient de suivre les procédures décrites dans le document d'orientation de l'OCDE relatif à l'essai de substances difficiles (13). Le recours à des solvants ou à des dispersants devrait être évité, mais peut se révéler nécessaire dans certains cas pour obtenir une solution mère de concentration appropriée pour l'exposition.

Outre les concentrations à tester, l'essai comprendra un témoin de l'eau de dilution et, si cela est impératif, un solvant témoin, avec le nombre de réplicats respectifs adéquat. Seuls les solvants ou les dispersants dont les effets sur la variable de réponse se sont avérés non significatifs ou minimes seront utilisés dans l'essai. Des exemples de solvants (p. ex. acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide et triéthylène glycol) et de dispersants (p. ex. Cremophor RH40, méthylcellulose 0,01 % et HCO-40) adéquats sont fournis dans le document (13). En cas d'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant, sa concentration finale ne dépasse pas 0,1 ml/l (13) et il est identique dans tous les récipients d'essai, sauf pour le témoin de l'eau de dilution. Cependant, on mettra tout en œuvre pour limiter la teneur en solvant autant que faire se peut.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Durée

La durée de l'essai est de 21 jours.

Charge

Les animaux parents sont répartis individuellement dans des récipients d'essai contenant en général 50 à 100 ml de milieu chacun (avec *Daphnia magna*, on peut abaisser ce volume, notamment pour les daphnies de plus petite taille comme *Ceriodaphnia dubia*), à moins qu'un essai dynamique ne soit requis.

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus grands, afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai, bien qu'il soit aussi possible de regrouper les réplicats aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 ml sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux *Daphnia*, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits.

Animaux d'essai

Pour les essais semi-statiques, on utilisera au moins 10 animaux répartis individuellement à chaque concentration d'essai et au moins 10 animaux répartis individuellement dans la série des témoins.

Pour les essais dynamiques, il s'avère approprié d'utiliser 40 animaux répartis en quatre groupes de 10 à chaque concentration d'essai (1). Un plus petit nombre d'organismes d'essai peut être utilisé, mais on recommande d'employer au moins 20 animaux par concentration, répartis dans au moins deux récipients contenant le même nombre d'animaux (p. ex. quatre réplicats contenant cinq daphnies chacun). On notera qu'en ce qui concerne les essais où les animaux sont maintenus en groupes, il sera impossible d'exclure un descendant de l'analyse statistique en cas de mort fortuite/accidentelle d'un parent à partir du moment où la reproduction a commencé. Le cas échéant, il faudra donc exprimer le taux de reproduction par le nombre total de descendants vivants par parent présent au début de l'essai.

Les traitements sont répartis de façon aléatoire entre les récipients d'essai, et toutes les manipulations ultérieures de ceux-ci se font de même. Faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures. En outre, si les résultats de l'essai sont susceptibles d'être affectés par une condition initiale ou liée à l'environnement, comme la situation dans le laboratoire, il faut envisager d'arrêter l'essai.

Alimentation

Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins trihebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Une dilution éventuelle des concentrations d'exposition due à l'administration de nourriture sera prise en compte et évitée autant que faire se peut, à l'aide de suspensions d'algues de concentration adéquate (voir paragraphe 29). Les écarts à ce régime (p. ex. dans les essais dynamiques) sont signalés.

Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents sera de préférence composé d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs espèces parmi les suivantes: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum*) et *Desmodesmus subspicatus* (anciennement *Scenedesmus subspicatus*). La nourriture est dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (14) a montré que pour *Daphnia magna*, des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisent pour produire le nombre de descendants vivants requis selon les critères de validité. On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai ou utiliser des teneurs plus faibles au début, que l'on augmentera afin de tenir compte de la croissance des animaux parents. Dans ce cas, la ration devra toujours contenir entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour, qui est la teneur recommandée.

Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (notamment pour des raisons pratiques, si la mesure de la teneur en carbone est trop longue), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme reliant le paramètre de remplacement à la teneur en carbone de la culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'appendice 3). Les nomogrammes devraient être vérifiés au moins une fois par an, et plus souvent si les conditions de culture des algues ont changé. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (15).

Il convient d'administrer une suspension d'algues concentrée aux *Daphnia* afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. On peut concentrer les algues par centrifugation, puis remise en suspension dans le milieu de culture des *Daphnia*.

Lumière

16 heures de lumière à une intensité ne dépassant pas $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mesurée au niveau de la surface de l'eau dans le récipient. En ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 1000 — 1500 lux pour la lumière blanche froide correspond étroitement à l'intensité lumineuse recommandée de $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Température

La température du milieu d'essai sera comprise entre 18 °C et 22 °C. Toutefois, dans un même essai, la température ne varie pas, si possible, quotidiennement de plus de 2 °C au sein de cet intervalle (p. ex. 18 — 20 °C, 19 — 21 °C ou 20 — 22 °C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

Aération

Les récipients d'essai ne sont pas aérés durant l'essai.

Dispositif d'essai

Essai préliminaire de détermination des concentrations

Si nécessaire, un essai de détermination de l'ordre de grandeur sera mené avec, par exemple, cinq concentrations du produit chimique d'essai. On utilisera deux réplicats par concentration d'essai et par témoin. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des produits chimiques similaires ou tirées d'études déjà publiées et portant sur la toxicité aiguë pour *Daphnia* et/ou d'autres organismes aquatiques peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur.

L'essai de détermination de l'ordre de grandeur dure 21 jours ou suffisamment longtemps pour prévoir l'ampleur des effets de manière fiable. À l'issue de cet essai, on étudie la reproduction de *Daphnia*. Le nombre de parents et la production de descendants sont consignés.

Essai définitif

Normalement, on teste au moins cinq concentrations d'essai qui encadrent la concentration efficace (p. ex. CE_x), et forment une série géométrique avec des concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 3.2. Il convient d'utiliser un nombre approprié de réplicats pour chaque concentration d'essai (voir paragraphes 24-25). L'étude de moins de cinq concentrations fait l'objet d'une justification. Il convient de ne pas tester les produits chimiques au-dessus de leur limite de solubilité dans le milieu d'essai. Avant de réaliser l'expérience, il est souhaitable d'examiner l'efficacité statistique du mode opératoire et de faire appel à des méthodes statistiques appropriées (4). Lors de l'établissement de la gamme de concentrations, il convient de tenir compte des points suivants:

- (i) Si l'on veut estimer une CE_x relative aux effets sur la reproduction, il est conseillé d'utiliser suffisamment de concentrations pour définir la CE_x avec un niveau de confiance satisfaisant. Dans l'idéal, les concentrations d'essai encadrent la CE_x estimée de manière à ce que cette dernière puisse être déterminée par interpolation plutôt que par extrapolation. L'analyse statistique qui suit est favorisée si davantage de concentrations d'essai sont utilisées (p. ex. 10) avec moins de réplicats pour chaque concentration (p. ex. 5, ce qui maintient constant le nombre total de récipients) et 10 témoins.
- (ii) Si l'on cherche à déterminer la CMEO et/ou la CSEO, la plus faible concentration testée est suffisamment basse pour que le taux de reproduction à cette concentration ne soit pas significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il convient de recommencer l'essai en abaissant la concentration la plus faible.
- (iii) Si l'on cherche à déterminer la CMEO et/ou la CSEO, la plus forte concentration testée est suffisamment élevée pour que le taux de reproduction à cette concentration soit significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il convient de recommencer l'essai en augmentant la concentration la plus forte, à moins que celle-ci corresponde déjà à la concentration maximale requise pour tester les effets chroniques (soit 10 mg/l).

Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration utilisée lors de la détermination de l'ordre de grandeur (p. ex. 10 mg/l), ou s'il est très probable que le produit chimique d'essai présentera une toxicité faible voire nulle du fait de son innocuité pour d'autres organismes et/ou parce que ces derniers l'absorbent peu ou pas du tout, il est possible de mener l'essai de reproduction comme un essai limite, en testant un témoin et une concentration de la substance d'essai de 10 mg/l, par exemple. Il convient alors d'utiliser dix réplicats pour les groupes exposés et pour les témoins. Si l'essai limite requiert un système dynamique, moins de réplicats pourront convenir. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Néanmoins, si des effets apparaissent à cette occasion, un essai complet sera normalement nécessaire.

Témoins

Il convient de tester une série de témoins du milieu d'essai et, le cas échéant, une série de témoins contenant le solvant ou le dispersant, parallèlement aux séries traitées avec le produit chimique d'essai. En cas de recours à un solvant ou à un dispersant, leur concentration est la même que dans les récipients qui contiennent le produit chimique d'essai. Il convient d'utiliser un nombre approprié de réplicats (voir paragraphes 23-24).

Généralement, dans un essai correctement mené, le coefficient de variation autour du nombre moyen de descendants vivants par animal parent dans le ou les groupes témoins est $\leq 25\%$, et cette information est communiquée pour les essais où les animaux sont maintenus dans des récipients individuels.

Renouvellement du milieu d'essai

La fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité du produit chimique d'essai, mais devrait être au moins trihebdomadaire. Si les essais préliminaires de stabilité (voir paragraphe 7) montrent que la concentration du produit chimique d'essai n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort de la gamme de 80 — 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration initiale mesurée) durant la période de renouvellement la plus longue (3 jours), il faut envisager de renouveler le milieu plus fréquemment ou de pratiquer un essai dynamique.

Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Il convient que le volume de milieu transféré avec les *Daphnia* soit le plus petit possible.

Observations

Les résultats des observations effectuées durant l'essai sont consignés dans des fiches de données (voir exemples aux appendices 4 et 5). Si d'autres mesures s'imposent (voir paragraphe 44), des observations supplémentaires pourront être requises.

Descendance

Les descendants engendrés par chaque animal parent seront de préférence retirés et comptés quotidiennement, dès la première portée, pour qu'ils ne consomment pas la nourriture destinée aux parents. Aux fins de la présente méthode d'essai, on ne compte que les descendants vivants, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts est signalée.

Mortalité

La mortalité des animaux parents est notée, de préférence quotidiennement, et au moins à chaque comptage des descendants.

Autres paramètres

Bien que la présente méthode d'essai soit avant tout destinée à évaluer les effets sur le taux de reproduction, il se peut que d'autres effets soient suffisamment chiffrés pour se prêter à une analyse statistique. On pourra ainsi rapporter le taux de reproduction par animal parent survivant, c'est-à-dire le nombre de descendants vivants produits pendant l'essai par parent survivant. Cette donnée pourra être comparée à la principale variable de réponse (taux de reproduction par animal parent présent au début de l'essai et qui n'est pas mort de manière fortuite ou accidentelle pendant l'expérience). Si une mortalité parentale se produit dans les réplicats exposés au produit chimique d'essai, il convient d'analyser si cette mortalité suit une courbe concentration-réponse, par exemple s'il existe une régression significative de la réponse par rapport à la concentration testée du produit chimique d'essai, avec une pente positive (un test statistique tel que le test de tendance de Cochran-Armitage peut être utilisé à cet effet). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les réplicats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité parentale suit une courbe de concentration-réponse, cette mortalité est assimilée à un effet du produit chimique testé et les réplicats ne sont pas exclus de l'analyse des résultats. Voir détails au paragraphe 51. La mesure de la croissance est très intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur les éventuels effets sublétaux, ce qui peut se révéler utile pour compléter les résultats sur la reproduction. On préconise de mesurer la longueur des animaux parents (la longueur du corps sans l'épine anale) à la fin de l'essai. D'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés: le moment de la première portée (et des portées suivantes), le nombre et la taille des portées par animal, le nombre de portées avortées, la présence de mâles parmi les néonates (OCDE, 2008) ou d'éphippies et, éventuellement, le taux intrinsèque d'accroissement de la population (voir définition à l'appendice 1 et procédures d'identification du sexe des néonates à l'appendice 7).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

La concentration de l'oxygène, la température, la dureté et le pH sont mesurés au moins une fois par semaine, avant et après le renouvellement des milieux, chez les témoins et dans les récipients qui renferment la concentration la plus élevée du produit chimique d'essai.

Au cours de l'essai, les concentrations du produit chimique à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration du produit chimique d'essai ne s'écartera pas de plus de 20 % de la concentration nominale (c'est-à-dire qu'elle restera comprise dans un intervalle de 80 à 120 %, voir paragraphes 6, 7 et 39), on recommande, au minimum, d'analyser les concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse, dès leur préparation et au moment du renouvellement, dans les milieux qui viennent d'être renouvelés et dans ceux qui sont sur le point de l'être, une fois au cours de la première semaine de l'essai (les analyses seront pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, juste après la préparation de la solution et au moment du renouvellement). Ces déterminations sont ensuite répétées selon une fréquence au moins hebdomadaire.

S'agissant des essais où la concentration du produit chimique d'essai n'est pas supposée demeurer dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, juste après leur préparation et au moment du renouvellement. Cependant, pour les essais où la concentration initiale mesurée du produit chimique d'essai sort de l'intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, mais pour lesquels on peut montrer de façon suffisamment convaincante que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire comprises dans un intervalle de 80 à 120 % des concentrations initiales), les déterminations chimiques peuvent se limiter durant les deuxième et troisième semaines aux concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse. En tout état de cause, la détermination de la concentration du produit chimique d'essai avant le renouvellement n'est nécessaire que sur un seul réplicat de chaque concentration d'essai.

Si on pratique un essai dynamique, il convient de recourir à un régime de prélèvements identique à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais l'analyse des solutions «anciennes» ne s'applique pas ici). Toutefois, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements durant la première semaine (p. ex. trois séries de mesures) afin de vérifier la stabilité des concentrations d'essai. Dans ces types d'essai, le débit du diluant et du produit chimique d'essai sont contrôlés chaque jour.

S'il s'avère que la concentration du produit chimique d'essai a pu être correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration initiale mesurée ou nominale, les résultats peuvent être déduits des valeurs initiales mesurées ou nominales. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à $\pm 20\%$, les résultats sont exprimés par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir les conseils de calcul à l'appendice 6).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Traitement des résultats

Le présent essai a pour objet d'établir l'effet du produit chimique d'essai sur le taux de reproduction. Le nombre total de descendants vivants par animal parent est calculé pour chaque récipient d'essai (c'est-à-dire pour chaque réplicat). En outre, la reproduction peut être évaluée en s'appuyant sur la production de descendants vivants par les organismes parents survivants. Cependant, la variable de réponse la plus pertinente du point de vue écologique est le nombre total de descendants vivants par animal parent qui n'est pas mort de manière accidentelle⁽¹⁾ ou fortuite⁽²⁾ au cours de l'essai. Si un animal parent meurt, soit accidentellement, soit de manière fortuite, ou s'il se révèle être un mâle, le réplicat est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de réplicats. Si un animal parent meurt dans un récipient recevant le produit chimique d'essai, il convient d'examiner si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, notamment s'il existe une régression importante de la réponse en fonction de la concentration de produit chimique d'essai avec une pente positive (on pourra appliquer un test statistique comme le test de tendance de Cochran — Armitage à cette fin). Si la mortalité ne correspond pas à une fonction concentration-réponse, les réplicats présentant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats de l'essai. Si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, la mortalité parentale est considérée comme un effet du produit chimique d'essai et les réplicats concernés ne sont pas exclus de l'analyse des résultats de l'essai.

En résumé, si les effets sont exprimés par la CMEO et la CSEO ou par la CE_x , il est recommandé de calculer les effets sur la reproduction selon les deux variables de réponse mentionnées précédemment, à savoir;

- le nombre total de descendants vivants par animal parent non décédé de manière accidentelle ou fortuite pendant l'essai;
- le nombre de descendants vivants par animal parent survivant;

puis de choisir comme résultat final la valeur la plus faible des CSEO et CMEO ou CE_x déterminées avec ces deux différentes variables.

Avant de lancer l'analyse statistique, par exemple de type ANOVA ou la comparaison des groupes de traitement et des groupes témoins avec les tests de Student (test t), de Dunnett, de Williams, ou de Jonckheere — Terpstra (méthode descendante), il est conseillé de vérifier s'il est nécessaire de transformer les données pour satisfaire les exigences d'un test statistique particulier. Des méthodes non paramétriques peuvent être envisagées, comme les tests de Dunn ou de Mann — Whitney. Les intervalles de confiance à 95 % sont calculés pour les moyennes établies aux différentes concentrations.

⁽¹⁾ Mortalité accidentelle: mortalité sans lien avec le produit chimique d'essai et due à un événement accidentel (dont la cause est donc connue)

⁽²⁾ Mortalité fortuite: mortalité sans lien avec le produit chimique d'essai, de cause inconnue

Le nombre de parents survivants dans les témoins non traités constitue un critère de validité crucial, et il convient qu'il soit consigné et signalé. Par ailleurs, on versera au rapport tout autre signe indiquant un effet nocif, par exemple un comportement anormal, ainsi que les résultats toxicologiques importants.

CE_x

On calcule les CE_x et leurs limites de confiance supérieures et inférieures en utilisant des méthodes statistiques adéquates (p. ex. fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman — Karber, ou simple interpolation). Pour calculer la CE₁₀, la CE₅₀ ou toute autre CE_x, on soumet la série complète de données à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

Dans le cas d'une analyse statistique visant à déterminer la CSEO ou la CMEO, il convient d'utiliser des méthodes statistiques adéquates (conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (4). En général, les effets indésirables du produit chimique d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale pour $p \leq 0,05$.

La distribution normale et l'homogénéité de la variance peuvent être vérifiées à l'aide d'un test statistique approprié, tel que le test de Shapiro — Wilk et le test de Levene, respectivement ($p \leq 0,05$). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être effectués. Des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests d'analyse de tendance descendante (tel que le test de William ou celui de Jonckheere — Terpstra, méthode descendante) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de produit chimique d'essai [on choisira le test recommandé conformément au Document d'orientation de l'OCDE 54 (4)]. On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (tels que le test U de Bonferroni conformément à Holm ou le test de tendance de Jonckheere — Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Un test t de variance inégale (comme le test de Welch) ou bien un test non paramétrique tel que le test U de Mann — Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

La détermination des différences significatives entre les témoins (témoin et solvant ou dispersant témoin), peut faire appel à l'analyse de plusieurs réplicats pour chaque témoin comme il est décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler tous les réplicats des témoins et du solvant témoin. Dans le cas contraire, on compare tous les traitements avec le solvant témoin.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai:

- clone (préciser si son génotype a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si on utilise une espèce autre que *Daphnia magna* il convient de le signaler et de le justifier.

Conditions d'essai:

- mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume, charge en nombre de *Daphnia* par litre);

- photopériode et intensité lumineuse;
- plan de l'essai (par exemple, nombre de réplicats, nombre de parents par récipient);
- détails du milieu de culture employé;
- le cas échéant, ajout de matière organique (préciser la composition, la source, la méthode de préparation, le COT et la DCO des solutions mères, une estimation du COT et de la DCO résultants dans le milieu d'essai);
- informations détaillées concernant l'alimentation, dont la quantité (en mg de *C/Daphnia*/jour) et l'horaire (p. ex. le type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture);
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant sont indiquées, le cas échéant).

Résultats:

- résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité du produit chimique d'essai;
- concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses permettant de déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les récipients d'essai (l'appendice 5 fournit des exemples de fiches de données); le rendement de récupération de la méthode et la limite de détermination sont aussi mentionnés;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (pH, température, concentration de l'oxygène dissous, COT et/ou DCO et dureté, le cas échéant) (l'appendice 4 donne un exemple de fiche de données);
- dénombrement complet des descendants vivants de chaque animal parent produits pendant l'essai (voir exemple de fiche de données à l'appendice 4);
- nombre et dates des décès chez les animaux parents (voir exemple de fiche de données à l'appendice 4);
- coefficient de variation du taux de reproduction chez les témoins (en fonction du nombre total de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai);
- graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent pour chaque réplicat, à l'exception des animaux parents morts de manière accidentelle ou fortuite, en fonction de la concentration du produit chimique d'essai;
- s'il y a lieu, graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent survivant dans chaque réplicat en fonction de la concentration du produit chimique d'essai;
- le cas échéant, concentration minimale avec effet observé (CMEO) sur la reproduction, y compris une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de l'ampleur de l'effet à prévoir (il est possible d'effectuer une analyse de l'efficacité avant de commencer l'essai pour fournir ces informations), et concentration sans effet observé (CSEO) sur la reproduction; s'il y a lieu, mentionner également la variable de réponse employée pour établir la CMEO et la CSEO (soit le nombre total de descendants vivants par organisme maternel non décédé de manière accidentelle ou fortuite pendant l'essai, soit le nombre total de descendants vivants par organisme maternel survivant) ainsi que la CMEO et la CSEO sur la mortalité des animaux parents;
- s'il y a lieu, CE_x pour la reproduction et intervalles de confiance (par exemple à 90 % ou 95 %), ainsi qu'un graphique du modèle ajusté employé pour ces calculs, la pente de la courbe concentration-réponse et son écart-type;
- autres effets biologiques observés ou mesurés: indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (p. ex. croissance des animaux parents) avec justification appropriée, le cas échéant;
- explication de tout écart par rapport à la méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
 - (2) OCDE (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 6. OCDE, Paris.
 - (3) OCDE (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 88. OCDE, Paris.
 - (4) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 54. OCDE, Paris.
 - (5) Baird, D.J., *et autres* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
 - (6) Elenđt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
 - (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
 - (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
 - (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
 - (10) Baird, D.J., *et autres* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
 - (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. et G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
 - (12) Cowgill, U.M. et Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
 - (13) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 23. OCDE, Paris.
 - (14) Sims, I.R., S. Watson. et D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
 - (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes sont utilisées dans le cadre de la présente méthode d'essai:

Mortalité accidentelle: mortalité non liée au produit chimique testé, et causée par un incident (c'est-à-dire par une cause connue).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

CE_x: concentration du produit chimique d'essai dissous dans l'eau qui entraîne une diminution de x pour cent de la reproduction chez *Daphnia*, durant une période d'exposition définie.

Mortalité fortuite: mortalité non liée au produit chimique testé, et de cause inconnue.

Taux intrinsèque d'accroissement de population: mesure de l'accroissement de la population qui intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge (1) (2) (3). Elle est nulle dans les populations à l'état stationnaire, positive dans les populations en croissance et négative dans les populations qui régressent. Cette dernière catégorie de population n'est évidemment pas durable et est vouée en fin de compte à l'extinction.

Limite de détection: la plus basse concentration susceptible d'être détectée, mais non chiffrée.

Limite de détermination: la plus basse concentration susceptible d'être mesurée quantitativement.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus basse à laquelle on a observé un effet statistiquement significatif du produit chimique sur la reproduction et la mortalité des animaux parents (à $p < 0,05$) par rapport au témoin, durant une période d'exposition définie. Cependant, il convient que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO produisent un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans les 15 secondes qui suivent l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, il convient que celle-ci soit stipulée avec sa référence).

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition définie.

Descendants: jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

Animaux parents: *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai et dont la capacité reproductrice représente l'objet de cette étude.

Taux de reproduction: nombre de descendants vivants issus d'animaux parents pendant la période d'essai.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Wilson, E.O. et Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. et Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

Appendice 2

PRÉPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTièrement DÉFINIS

Acclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (1) et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 pour cent d'Elendt, puis à 60 pour cent d'Elendt et enfin à 100 pour cent d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

Préparation

Éléments traces

Des solutions mères (I), contenant chacune un seul élément trace, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. A partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les éléments traces (solution combinée), à savoir:

| Solution(s) mère(s) I (substance unique) | Quantité ajoutée à l'eau | Concentration (par rapport au milieu M4) | Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau | |
|--|-----------------------------|--|---|------|
| | | | mg/l | ml/l |
| | | | M4 | M7 |
| H ₃ BO ₃ | 57 190 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| MnCl ₂ · 4 H ₂ O | 7 210 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| RbCl | 1 420 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| SrCl ₂ · 6 H ₂ O | 3 040 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O | 1 260 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| CuCl ₂ · 2 H ₂ O | 335 | 20 000-fois | 1,0 | 0,25 |
| ZnCl ₂ | 260 | 20 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 200 | 20 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| KI | 65 | 20 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| Na ₂ SeO ₃ | 43,8 | 20 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| NH ₄ VO ₃ | 11,5 | 20 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O | 5 000 | 2 000-fois | — | — |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 1 991 | 2 000-fois | — | — |

Les solutions de Na₂EDTA et de FeSO₄ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne:

| | | | | |
|---------------------|--|------------|------|-----|
| Solution de Fe-EDTA | | 1 000-fois | 20,0 | 5,0 |
|---------------------|--|------------|------|-----|

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, des macronutriments et des vitamines, de la façon suivante:

| | Quantité ajoutée à l'eau | Concentration (par rapport au milieu M4) | Quantité de solution mère ajoutée pour préparer le milieu | |
|--|--------------------------|--|---|-----|
| | | | ml/l | |
| | mg/l | | M4 | M7 |
| Solution mère II (combinaison de substances en traces) | | 20-fois | 50 | 50 |
| Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution) | | | | |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 293 800 | 1 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 246 600 | 2 000-fois | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000-fois | 0,1 | 0,1 |
| NaHCO ₃ | 64 800 | 1 000-fois | 1,0 | 1,0 |
| Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O | 50 000 | 5 000-fois | 0,2 | 0,2 |
| NaNO ₃ | 2 740 | 10 000-fois | 0,1 | 0,1 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 430 | 10 000-fois | 0,1 | 0,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 840 | 10 000-fois | 0,1 | 0,1 |
| Solution mère de vitamines combinées | — | 10 000-fois | 0,1 | 0,1 |

La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:

| | mg/l | | | |
|------------------------------------|------|-------------|--|--|
| Chlorhydrate de thiamine | 750 | 10 000-fois | | |
| Cyanocobalamine (B ₁₂) | 10 | 10 000-fois | | |
| Biotine | 7,5 | 10 000-fois | | |

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

N.B.: Afin d'éviter que les sels ne précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, on ajoute les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 ml d'eau désionisée et on amène le volume à un litre.

N.N.B: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasm*, 154, 25-33.

Appendice 3

ANALYSE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT) ET ÉTABLISSEMENT D'UN NOMOGRAMME POUR LA TENEUR EN COT DANS LES ALIMENTS À BASE D'ALGUES

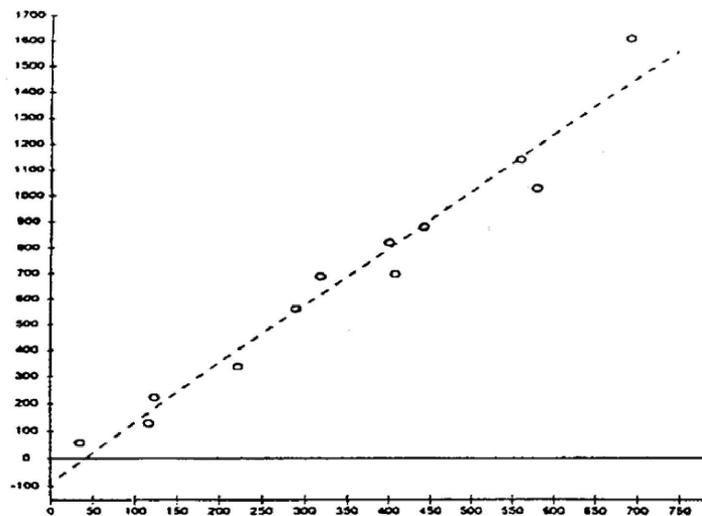
Il est admis que la teneur en carbone des algues alimentaires n'est généralement pas mesurée directement, mais déduite de corrélations (par nomogramme) avec des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière.

Il faudrait mesurer le COT par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes aux UV ou au persulfate. (Pour s'orienter voir: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pour établir le nomogramme, il y a lieu d'isoler les algues du milieu de croissance par une centrifugation suivie d'une remise en suspension dans de l'eau distillée. On mesure le paramètre de remplacement et la teneur en COT dans chaque échantillon, produit en triple exemplaire. Les témoins contenant uniquement de l'eau distillée devraient être analysés et la teneur en COT déduite de celle de l'échantillon contenant les algues.

Les nomogrammes devraient être linéaires sur la gamme de teneurs en carbone utilisée. Des exemples sont présentés ci-dessous.

N.B. Ces exemples ne doivent pas être utilisés pour les conversions; il est indispensable que les laboratoires établissent leurs propres nomogrammes.



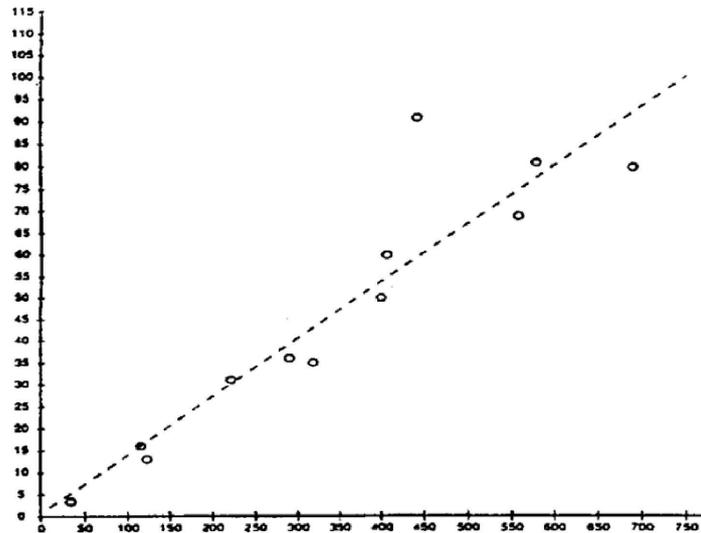
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Régression des mg/l de poids sec en fonction des mg de C/l. Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillée.

Axe des x: mg de C/l d'algues alimentaires concentrées

Axe des y: mg/l de poids sec d'algues alimentaires concentrées

Coefficient de corrélation – 0,980



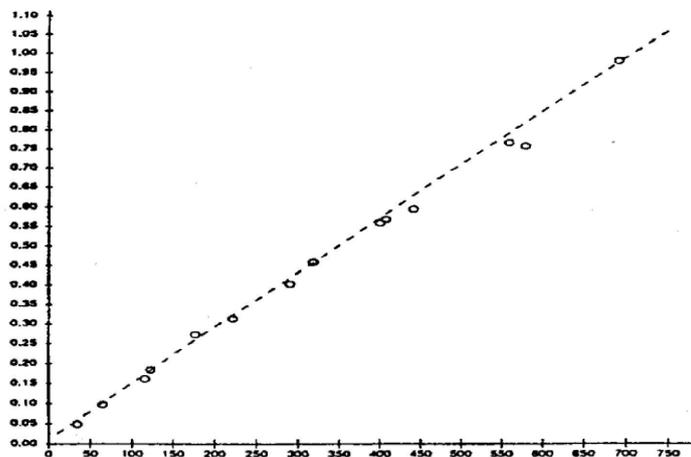
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Régression du nombre de cellules en fonction des mg de C/1. Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillée.

Axe des x: mg de C/1 d'algues alimentaires concentrées

Axe de y: nombre de cellules/1 d'algues alimentaires concentrées

Coefficient de corrélation – 0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Régression de l'absorbance en fonction des mg de C/1 (longueur du trajet optique: 1 cm). Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillée.

Axe des x: mg de C/1 d'algues alimentaires concentrées

Axe des y: Absorbance à 440 nm dans une dilution à 1/10 d'une solution d'algues alimentaires concentrées

Coefficient de corrélation – 0,998

Appendice 4

EXEMPLE DE FICHE POUR CONSIGNER LE RENOUELEMENT DU MILIEU, LES DONNÉES DE SURVEILLANCE PHYSICO-CHIMIQUE, L'ALIMENTATION, LA REPRODUCTION DES DAPHNIES ET LA MORTALITÉ DES PARENTS

| Expérience n°: | Date de début: | | | | | Clone: | | Milieu: | | | | | Type d'alimenta- tion: | | | | | Produit chimique d'essai: | | | | | Concentration nominale: | | |
|-------------------------------------|----------------|---|---|---|---|--------|---|---------|---|---|---|----|---------------------------|----|----|----|----|------------------------------|----|----|----|----|-------------------------|--|---------|
| | Jour | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
| Renouvellement du milieu (cocher) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH (*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | nouveau |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ancien |
| O ₂ (mg/l) (*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | nouveau |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ancien |
| Temp (°C) (*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | nouveau |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ancien |
| Alimentation fournie (cocher) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nbre descendants vivants (**) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
| Récipient 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
| Mortalité cumulée des parents (***) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(*) Indiquer quel récipient a été utilisé pour l'essai
 (***) Indiquer la mortalité d'un quelconque animal parent par la lettre "M" dans la case appropriée
 (**) Indiquer les portées avortées par les lettres "AB" dans la case appropriée

Appendice 6

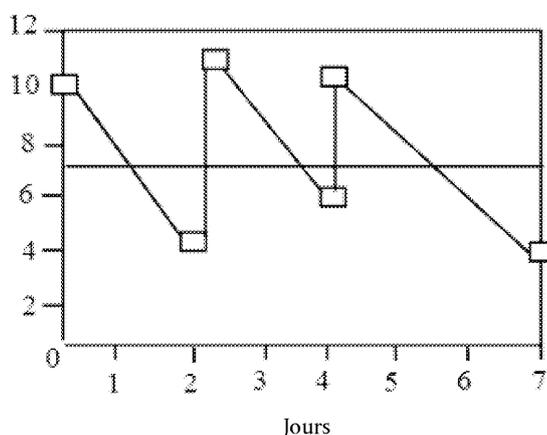
CALCUL D'UNE MOYENNE PONDEREE SUR LE TEMPS

Moyenne pondérée sur le [en fonction du] temps

Etant donné que la concentration du produit chimique d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre les renouvellements du milieu, il est nécessaire de rechercher la concentration qui devrait être considérée comme représentative de la gamme de concentrations que subissent les Daphnia parents. Le choix devrait s'appuyer sur des considérations biologiques aussi bien que statistiques. Si on estime, par exemple, que la reproduction est surtout affectée par la concentration maximale, il convient d'utiliser la concentration maximale. Si, par contre, on juge que c'est l'effet cumulé ou à long terme du produit chimique toxique qui est prépondérant, il est plus pertinent de prendre une concentration moyenne. Dans ce cas, la concentration moyenne pondérée sur le temps convient, puisqu'elle tient compte de la variation de la concentration instantanée en fonction du temps.

Figure 1

Exemple de moyenne pondérée sur le [en fonction] du temps



La figure 1 illustre un essai (simplifié) qui dure sept jours et dans lequel le milieu est renouvelé aux jours 0, 2 et 4.

- La ligne fine en zigzag représente la concentration en fonction du temps. La chute de concentration est supposée suivre une évolution exponentielle.
- Les six points portés sur le graphique représentent les concentrations observées mesurées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.
- La ligne épaisse indique la position de la moyenne pondérée sur le temps.

La moyenne pondérée sur le temps est calculée de façon que la superficie comprise en dessous de la moyenne pondérée en fonction du temps soit égale à la superficie située en dessous de la courbe de concentration. Le calcul correspondant à l'exemple figurant ci-dessus est illustré au tableau 1.

Tableau 1

Calcul de la moyenne pondérée en fonction du temps

| Renouvellement n° | Jours | Conc 0 | Conc 1 | Ln(Conc 0) | Ln(Conc 1) | Superficie |
|-------------------|-------|--------|--------|------------|------------|------------|
| 1 | 2 | 10,000 | 4,493 | 2,303 | 1,503 | 13,767 |
| 2 | 2 | 11,000 | 6,037 | 2,398 | 1,798 | 16,544 |

| Renouvellement n° | Jours | Conc 0 | Conc 1 | Ln(Conc 0) | Ln(Conc 1) | Superficie |
|------------------------|-------|--------|--------|------------|--------------------|------------|
| 3 | 3 | 10,000 | 4,066 | 2,303 | 1,403 | 19,781 |
| Nombre total de jours: | 7 | | | | Superficie totale: | 50,092 |
| | | | | | Moyenne PT: | 7,156 |

Jours correspond au nombre de jours de la période de renouvellement

Conc 0 est la concentration mesurée au début de chaque période de renouvellement

Conc 1 est la concentration mesurée à la fin de chaque période de renouvellement

$\text{Ln}(\text{Conc } 0)$ est le logarithme népérien de *Conc 0*

$\text{Ln}(\text{Conc } 1)$ est le logarithme népérien de *Conc 1*

La *superficie* est celle comprise en dessous de la courbe exponentielle de chaque période de renouvellement. Elle se calcule par la formule suivante:

$$\text{Superficie} = \frac{\text{Conc } 0 - \text{Conc } 1}{\text{Ln}(\text{Conc } 0) - \text{Ln}(\text{Conc } 1)} \times \text{Jours}$$

La moyenne pondérée sur le temps (*moyenne PT*) est la *superficie* totale divisée par le *nombre total de jours*.

Bien entendu, dans le cas de l'essai de reproduction chez *Daphnia*, le tableau devrait être étendu à 21 jours.

Il est clair que lorsque les observations ne sont faites qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que la chute de concentration est effectivement exponentielle. Une courbe différente donnerait lieu à un calcul différent de la *superficie*. Cependant, une chute de concentration exponentielle est plausible et constitue probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Il convient toutefois d'être prudent si l'analyse chimique ne détecte aucun produit chimique à la fin de la période de renouvellement. Tant qu'il n'est pas possible d'estimer la vitesse de disparition du produit chimique dans la solution, il est impossible d'obtenir une *superficie* réaliste sous la courbe et, partant, une *moyenne pondérée* sur le temps qui soit raisonnable.

Appendice 7

GUIDE POUR L'IDENTIFICATION DU SEXE DES NOUVEAUX-NÉS

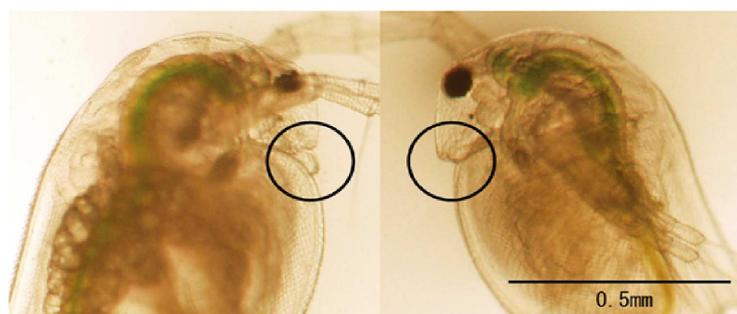
La production de mâles parmi les descendants peut avoir lieu sous certaines conditions environnementales changeantes, telles qu'un raccourcissement de la photopériode, des variations de températures, une diminution de la concentration en nourriture, et une densité de population accrue (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven et al, 1992). La production de mâles est aussi connue comme une réponse à certains régulateurs de croissance d'insectes (Oda et al, 2005). Dans des conditions où les facteurs de stress chimiques induisent une diminution des descendants issus de femelles parthénogéniques, un nombre accru de mâles serait attendu (OECD, 2008). Sur la base des informations disponibles, il n'est pas possible de prédire, entre le sexe des descendants ou l'effet sur la reproduction, laquelle de ces mesures sera la plus sensible; cependant il existe des indications (OECD, 2008) tendant à montrer que l'induction de mâles dans la descendance pourrait être moins sensible que le nombre de descendants. Puisque l'objectif principal de la méthode d'essai est d'évaluer le nombre de descendants produits, l'apparition de mâle dans cette descendance est une observation optionnelle. Si cette mesure optionnelle est évaluée dans une étude, alors il convient d'appliquer un critère de validité supplémentaire aux témoins: les témoins ne contiennent pas plus de 5 % de descendants mâles.

La manière la plus pratique et la plus aisée de différencier le sexe des daphnies est d'utiliser leurs caractéristiques phénotypiques, puisque les mâles et les femelles sont génétiquement identiques et leur sexe est déterminé par les conditions environnementales. Les mâles et les femelles diffèrent par leur longueur et par la morphologie de leurs premières antennes qui sont plus longues chez les mâles que chez les femelles (figure 1). Cette différence est reconnaissable dès la naissance, bien que d'autres caractéristiques sexuelles secondaires se développent à mesure que les animaux grandissent (voir figure 2 dans Olmstead et Leblanc, 2000).

Afin d'observer le sexe morphologique, les descendants produits par chaque parent sont transférés au moyen d'une pipette et placés dans une boîte de pétri contenant le milieu d'essai. Le milieu d'essai est maintenu au minimum pour minimiser les mouvements des animaux. L'observation de la première antenne peut être effectuée sous un stéréomicroscope (x10-60).

Figure. 1

mâle (à gauche) et femelle (à droite) de *D. magna* âgés de 24 heures. Les mâles peuvent se distinguer des femelles par la longueur et la morphologie de leur première paire d'antennes, comme indiqué dans le cercle (Tatarazako et al., 2004).



BIBLIOGRAPHIE

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OCDE, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Série sur les essais et l'évaluation, n° 88. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environmental Science* 17, 439-449.»

▼B**C.21. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE****1. MÉTHODE**

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 216 (2000) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation de l'azote par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (3) de la SETAC (4) et de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (5), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (6), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (7) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate. Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation de l'azote est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués: l'essai de transformation de l'azote et l'essai de transformation du carbone. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification commerciaux (nitrapyrine), un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation de l'azote à la surface aérobie des sols. La méthode d'essai permet également d'estimer les effets des substances sur la transformation du carbone par la microflore du sol. La formation de nitrate se produit par suite de la dégradation des liaisons carbone-azote. Par conséquent, si l'on trouve des taux identiques de production de nitrate dans des sols traités et dans les sols témoins, il est très probable que les voies de dégradation principales du carbone soient intactes et fonctionnelles. Le substrat choisi pour l'essai (farine de luzerne en poudre) présente un bon rapport carbone-azote (généralement entre 12/1 et 16/1). De ce fait, la carence en carbone est réduite pendant l'essai et si la population microbienne est endommagée par une substance chimique, elle peut se reconstituer dans un délai de 100 jours.

▼B

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus avant tout pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple, des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux produits agrochimiques. En modifiant la quantité de substance-d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on détermine les effets d'une série de concentrations sur la transformation de l'azote pour les substances chimiques autres que les produits agrochimiques. L'essai peut également être utilisé pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité qui pénètre dans le sol. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_x , où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2. DÉFINITIONS

Transformation de l'azote: dégradation par des micro-organismes de la matière organique contenant de l'azote, par le processus d'ammonification et de nitrification, en son produit final, le nitrate inorganique.

CE_x (concentration produisant x % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x pour cent d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 pour cent (50 %) d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sol tamisé est amendé avec de la farine végétale en poudre puis traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, des échantillons de sol traité et des échantillons témoins sont extraits avec un solvant approprié, et les quantités de nitrate présentes dans les extraits sont déterminées. Le taux de formation de nitrate dans les échantillons traités est comparé au taux des échantillons témoins, et l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin est calculé. Tous les essais durent au moins 28 jours. Si, au 28^e jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures sont poursuivies pendant une durée maximale de 100 jours. Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série de concentrations de substance d'essai sont ajoutées aux échantillons de sol, et les quantités de nitrate formées dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont mesurées au bout de 28 jours d'incubation. Les résultats des essais avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre les concentrations en nitrate dans les échantillons témoins et les échantillons traités, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire: incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le paragraphe 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échangé gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches au gaz. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Le matériel courant de laboratoire suivant est utilisé:

- agitateur: agitateur mécanique ou équivalent;
- centrifugeuse (3 000 g) ou appareil de filtration (avec du papier filtre sans nitrate);
- instrument de sensibilité et de reproductibilité adapté à l'analyse des nitrates.

1.6.2. **Sélection et nombre de sols**

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes:

- teneur en sable: supérieure à 50 % et inférieure à 75 %,
- pH: 5,5 - 7,5,
- teneur en carbone organique: 0,5 — 1,5 %,
- la biomasse microbienne doit être mesurée (8) (9) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques représente les conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

▼B**1.6.3. Prélèvement et stockage des échantillons de sol****1.6.3.1. Prélèvement**

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement aux produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant le prélèvement des échantillons. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture et aucun échantillon de sol ne doit être prélevé que trois mois au moins après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais ayant des effets biocides connus (comme le cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâturage) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple).

Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2. Stockage

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois entre moins 18 °C et moins 22 °C. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le paragraphe 1.6.2).

1.6.4 Manipulation et préparation du sol pour l'essai**1.6.4.1 Pré-incubation**

Si le sol a été stocké (voir le paragraphe 1.6.3.2), il est recommandé de procéder à une pré-incubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la pré-incubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les paragraphes 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

▼B1.6.4.2 *Propriétés physico-chimiques*

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon de sol doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.4.3 *Amendement à l'aide d'un substrat organique*

Le sol doit être amendé à l'aide d'un substrat organique approprié, comme de la farine de luzerne verte en poudre (composant principal: *Medicago sativa*) avec un rapport C/N situé entre 12/1 et 16/1. Le rapport luzerne-sol recommandé est de 5 g de luzerne par kilogramme de sol (poids sec).

1.6.5 **Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol**

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie: 0,1 - 0,5mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme) car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6 **Concentrations d'essai**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévu. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'une application. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x .

▼B

1.7. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.7.1. **Conditions expérimentales**1.7.1.1. *Traitement et contrôle*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées à l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois réplicats de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois réplicats de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage de l'échantillon de sol.

1.7.1.2. *Incubation des échantillons de sol*

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons: sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de réplicats utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les réplicats et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires d'échantillons du sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le paragraphe 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3. *Conditions et durée de l'essai*

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le paragraphe 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les taux de formation de nitrate dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si ceux-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours. En ce qui concerne les produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de nitrate dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

▼B**1.7.2. Prélèvement et analyse des sols****1.7.2.1. Échelonnement des prélèvements**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure du nitrate aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer le nitrate au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin de mesurer la quantité initiale de nitrate dans le sol.

1.7.2.2. Analyse des échantillons de sol

La quantité de nitrate formé dans chaque échantillon traité et dans chaque témoin est déterminée à chaque temps de prélèvement. Le nitrate est extrait du sol en agitant les échantillons en présence d'un solvant d'extraction, par exemple, une solution de 0,1 M de chlorure de potassium. Un rapport de 5 ml de solution de KCl par gramme d'équivalent poids sec de sol est recommandé. Afin d'optimiser l'extraction, les récipients contenant le sol et la solution d'extraction ne doivent pas être remplis à plus de la moitié de leur contenance. Les mélanges sont agités à 150 tpm pendant 60 minutes. Les mélanges sont centrifugés ou filtrés et les phases liquides sont analysées pour mesurer le nitrate. Les extraits liquides débarrassés de particules peuvent être stockés à moins 20 ± 5 °C pendant une durée pouvant aller jusqu'à six mois avant d'être analysés.

2. DONNÉES**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque échantillon de sol doit être enregistrée, et les valeurs moyennes de tous les répliquats doivent être présentées sous forme de tableau. Les taux de transformation de l'azote doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les quantités de nitrate formé sont exprimées en mg nitrate/kg poids sec/jour. On compare le taux de formation de nitrate dans chaque échantillon traité avec le taux dans le témoin, et on calcule l'écart en pourcentage par rapport au témoin.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque répliquat est déterminée, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x . Les quantités de nitrate (mg nitrate/kg poids sec de sol) trouvées dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparées aux quantités observées dans les échantillons témoins. À partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x . Les seuils de confiance ($p = 0,95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standards (10) (11) (12).

Les substances d'essai qui contiennent d'importantes quantités d'azote peuvent être à l'origine des quantités de nitrate qui se forment pendant l'essai. Si ces substances sont testées à une concentration élevée (par exemple, dans le cas des substances chimiques destinées à être utilisées en applications répétées), des contrôles appropriés doivent être prévus dans l'essai (sol plus substance d'essai mais sans farine végétale). Les résultats de ces contrôles doivent être pris en compte dans le calcul des valeurs CE_x .

▼B

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de formation de nitrate entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et le témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation de l'azote dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE₅₀, CE₂₅ et/ou CE₁₀.

3. **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Identification complète du sol utilisé à savoir:

- coordonnées géographiques du site (latitude, longitude),
- information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.),
- type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.),
- profondeur du prélèvement (cm),
- teneur en sable/limon/argile (% poids sec),
- valeurs du pH (dans l'eau),
- teneur en carbone organique (% poids sec),
- teneur en azote (% poids sec),
- concentration initiale en nitrate (mg nitrate/kg poids sec),
- capacité d'échange cationique (mmol/kg),
- biomasse microbienne en pourcentage du carbone organique total,
- référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre,
- toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol,
- détails de la pré-incubation du sol s'il y a lieu.

Substance d'essai:

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,
- données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, comprenant la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Substrat:

- source du substrat,
- composition (farine de luzerne, farine de luzerne verte),
- teneur en carbone, azote (% poids sec),
- taille du tamis (mm).

▼B

Conditions de l'essai:

- détails de la modification du sol avec un substrat organique,
- nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées,
- procédure d'application de la substance d'essai au sol,
- température d'incubation,
- teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai,
- méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels),
- nombre de réplicats,
- temps de prélèvement,
- méthode utilisée pour l'extraction du nitrate du sol.

Résultats:

- procédure analytique et matériel utilisé pour analyser le nitrate,
- tableaux indiquant les valeurs individuelles et moyennes des mesures du nitrate,
- variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins,
- explications des corrections apportées aux calculs, le cas échéant,
- la variation en pourcentage des taux de formation de nitrate à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE₅₀ avec une limite de confiance de 95 pour cent, les autres valeurs CE_x (CE₂₅ ou CE₁₀) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse,
- traitement statistique des résultats,
- toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4

RÉFÉRENCES

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24, p. 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.

▼B

- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, p. 18-20, January 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J.T. and WUcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol, and Exper. Ther.*, 96, p. 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

▼B**C.22. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE****1. MÉTHODE**

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 217 (2000) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation du carbone par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (3) et de la SETAC (4), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (5), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (6) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate.

Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation du carbone est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués: l'essai de transformation du carbone et l'essai de transformation de l'azote. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification (nitrapyrine) commerciaux, un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

▼B

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation du carbone à la surface aérobie des sols. L'essai est sensible aux changements de taille et d'activité des colonies microbiennes responsables de la transformation du carbone puisqu'il soumet ces colonies à la fois au stress chimique et à la carence en carbone. Un sol sableux pauvre en matière organique est utilisé. Ce sol est traité avec la substance d'essai et il est incubé dans des conditions permettant un métabolisme microbien rapide. Dans ces conditions, les sources de carbone présentes dans le sol sont rapidement épuisées. Cela provoque la carence en carbone qui tue à la fois les cellules microbiennes et qui induit la dormance et/ou la sporulation. Si la durée de l'essai est supérieure à 28 jours, on peut mesurer la somme de ces réactions dans les témoins (sol non traité) en mesurant la perte progressive de biomasse microbienne active métaboliquement (7). Si la biomasse d'un sol carence en carbone, dans les conditions de l'essai, est affectée par la présence d'une substance chimique, celle-ci peut ne pas retrouver le même niveau que l'échantillon témoin. C'est pourquoi la perturbation provoquée par la substance d'essai à n'importe quel moment de l'essai perdurera souvent jusqu'à la fin de l'essai.

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus principalement pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées. En modifiant à la fois la quantité de substance d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on peut également utiliser l'essai pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité susceptible d'atteindre le sol. C'est pourquoi, dans le cas des produits non agrochimiques, les effets d'une série de concentrations sur la transformation du carbone sont déterminés. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_x , où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2. DÉFINITIONS

Transformation du carbone: dégradation par des micro-organismes de la matière organique en son produit final, le dioxyde de carbone inorganique.

CE_x (concentration produisant x % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x % d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 % d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sol tamisé est traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, les échantillons de sol traité et les échantillons témoins sont mélangés avec du glucose, et les taux de respiration induits par le glucose sont mesurés pendant 12 heures consécutives. Les taux de respiration sont exprimés en dioxyde de carbone dégagé (mg dioxyde de carbone/kg sol sec/h) ou oxygène consommé (mg oxygène/kg sol/h). On compare le taux moyen de respiration dans les échantillons de sol traité avec celui des échantillons témoins et on calcule l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin. Tous les essais ont une durée de 28 jours au moins. Si, au 28^e jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures se poursuivent à intervalles de 14 jours pendant une durée maximale de 100 jours. Si l'essai porte sur des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, une série de concentrations de la substance d'essai est ajoutée aux échantillons de sol, et les taux de respiration induits par le glucose (moyenne des quantités de dioxyde de carbone formé ou l'oxygène consommé) sont mesurés au bout de 28 jours. Les résultats des essais effectués avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé dans (ou par) les échantillons témoins et les échantillons de sol traité, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le point 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échange gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Pour déterminer la respiration induite par le glucose, des systèmes d'incubation et des instruments de mesure de la production de dioxyde de carbone ou de la consommation d'oxygène sont nécessaires. On trouve des exemples de ces systèmes et de ces instruments dans la littérature (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Sélection et nombre de sols**

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes:

— teneur en sable: supérieure à 50 % et inférieure à 75 %,

▼B

- pH: 5,5-7,5,
- teneur en carbone organique: 0,5-1,5 %,
- la biomasse microbienne doit être mesurée (12) (13) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques correspond aux conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

1.6.3. **Prélèvement et stockage des échantillons de sol**

1.6.3.1. *Prélèvement*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement avec des produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant les prélèvements. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture, et les échantillons de sol ne doivent être prélevés qu'au moins trois mois après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais aux effets biologiques connus (cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâturage) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple). Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois à -18 °C. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le point 1.6.2).

▼B**1.6.4. Manipulation et traitement du sol pour l'essai****1.6.4.1. Préincubation**

Si le sol a été stocké (voir les points 1.6.4.2 et 1.7.1.3), il est recommandé de procéder à une préincubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la préincubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les points 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

1.6.4.2. Propriétés physico-chimiques

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.5. Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie: 0,1-0,5 mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme), car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6. Concentrations d'essai

Si l'essai porte sur des produits phytosanitaires ou sur d'autres substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévues. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'application unique.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x .

▼B

1.7. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.7.1. **Conditions expérimentales**1.7.1.1. *Traitement et contrôle*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées avec l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois répliqués de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois répliqués de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage du sol.

1.7.1.2. *Incubation des échantillons de sol*

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons: sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de répliqués utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les répliqués et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires de sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le point 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3. *Conditions et durée de l'essai*

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le point 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si celles-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours, si celle-ci est la plus courte. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

▼B**1.7.2. Prélèvement et analyse des sols****1.7.2.1. Échelonnement des prélèvements**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure des taux de respiration induits par le glucose aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer la respiration induite par le glucose au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin d'estimer les quantités initiales de biomasse microbienne métaboliquement active dans le sol (12).

1.7.2.2. Mesure des taux de respiration induits par le glucose

Le taux de respiration induit par le glucose est déterminé dans chaque échantillon de sol traité et dans chaque témoin à chaque temps de prélèvement. Les échantillons de sol sont mélangés avec une quantité de glucose suffisante pour entraîner une réaction respiratoire maximale immédiate. La quantité de glucose nécessaire pour provoquer une réaction respiratoire maximale dans un sol donné peut être déterminée dans un essai préliminaire à l'aide d'une série de concentrations de glucose (14). Toutefois, dans le cas des sols sableux contenant 0,5-1,5 % de carbone organique, 2 000 mg à 4 000 mg de glucose par kg de poids sec sont généralement suffisants. Le glucose peut être réduit en poudre avec du sable de quartz propre (10 g sable/kg poids sec) et mélangé de façon homogène avec le sol.

Les échantillons de sol amendés avec le glucose sont incubés dans un appareil adapté pour mesurer les taux de respiration en continu, toutes les heures, ou toutes les deux heures (voir point 1.6.1) à 20 ± 2 °C. Le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé est mesuré pendant 12 heures consécutives et les mesures doivent commencer le plus rapidement possible, c'est-à-dire 1 à 2 heures après l'adjonction de glucose. On mesure la quantité totale de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé pendant les 12 heures et on détermine le taux moyen de respiration.

2 DONNÉES**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé par chaque réplicat doit être enregistré, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les résultats doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les taux de respiration induits par le glucose sont exprimés en mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h. Le taux moyen de formation de dioxyde de carbone ou le taux moyen de consommation d'oxygène de chaque échantillon traité est comparé à celui du témoin, et l'écart en pourcentage par rapport au témoin est calculé.

▼B

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans chaque réplicat sont déterminées, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x . Les taux de respiration induits par le glucose (mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h) observés dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparés à ceux des échantillons témoins. À partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x . Les seuils de confiance ($p = 0,95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standard (15) (16) (17).

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de respiration entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et l'échantillon témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation du carbone dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10} .

3. RAPPORT D'ESSAI

RAPPORT DE L'ESSAI

Le rapport de l'essai doit comporter les informations suivantes:

Identification complète du sol utilisé, à savoir:

- coordonnées géographiques du site (latitude, longitude),
- information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.),
- type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.),
- profondeur du prélèvement (cm),
- teneur en sable/limon/argile (% poids sec),
- pH (dans l'eau),
- teneur en carbone organique (% poids sec),
- teneur en azote (% poids sec),
- capacité d'échange cationique (mmol/kg),
- biomasse microbienne initiale en pourcentage du carbone organique total,
- référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre,
- toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol,
- détails de la préincubation du sol s'il y a lieu.

▼B

Substance d'essai:

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,
- données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, notamment la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Conditions de l'essai:

- détails de la modification du sol avec un substrat organique,
- nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées,
- procédure d'application de la substance d'essai au sol,
- température d'incubation,
- teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai,
- méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels),
- nombre de réplicats,
- temps de prélèvement.

Résultats:

- méthode et matériel utilisés pour mesurer les taux de respiration,
- tableaux indiquant les valeurs individuelles et les valeurs moyennes des quantités de dioxyde de carbone ou d'oxygène,
- variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins,
- explications des corrections apportées aux calculs, s'il y a lieu,
- la variation en pourcentage des taux de respiration induits par le glucose à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 %, les autres valeurs CE_x (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse,
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu,
- toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24, p. 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3, p. 45-60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41, p. 831-871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests, for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116, p. 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38, p. 113-120.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol, and Exper. Ther.*, 96, p. 99-113.
- (16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

▼B**C.23. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LE SOL****1. MÉTHODE**

La présente méthode d'essai reprend la méthode TG 307 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode décrite ici est conçue pour mesurer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques dans le sol. Les expériences ont pour but de déterminer i) le taux de transformation de la substance d'essai, et ii) la nature des produits de transformation auxquels les végétaux et les organismes du sol peuvent être exposés, ainsi que les taux de formation et de déplétion de ces produits. Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont appliquées directement sur le sol ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement du sol. Les résultats de ces études de laboratoire peuvent également être utilisés pour mettre au point des protocoles d'échantillonnage et d'analyse destinés à des études dans des domaines voisins.

Il est généralement suffisant d'effectuer des études aérobies et anaérobies avec un seul type de sol pour déterminer les voies de transformation (8) (10) (11). Les taux de transformation doivent être déterminés dans trois autres sols au moins (8) (10).

Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, organisé à Belgirate, en Italie, en 1995 (10), a défini notamment le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai. Les types de sol testés doivent être représentatifs des conditions environnementales d'utilisation ou de rejet prévus. Par exemple, les substances chimiques devant être appliquées sous des climats subtropicaux ou tropicaux doivent être testées avec des Ferrasols ou des Nitosols (système FAO). Cet atelier a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol, sur la base des lignes directrices de l'ISO (15). L'utilisation de sols de rizières est également étudiée dans le cadre de cette méthode.

1.2. DÉFINITIONS

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation: toute substance résultant de réactions de transformations biotiques ou abiotiques de la substance d'essai et en particulier le CO₂ et les produits qui se trouvent dans les résidus liés.

Résidus liés: les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous forme de la substance mère ou de ses métabolite(s)/produits de transformation. La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par des méthodes d'extraction qui modifient la matrice et par des techniques analytiques complexes. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente, ionique et de la liaison par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (12) [modifié d'après l'UICPA 1984 (13)].

Transformation aérobie: réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (14).

▼B

Transformation anaérobie: réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (14).

Sol: mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote, et à poids moléculaire élevé, contenant de petits (principalement micro) organismes. Le sol peut être manipulé sous deux formes:

- a) non brassé, tel qu'il s'est formé au cours du temps, en couches caractéristiques d'un grand nombre de types de sol;
- b) brassé, tel qu'on le trouve habituellement dans les terres arables ou qu'il est recueilli en creusant et tel qu'il est utilisé dans la présente méthode d'essai (14).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé marqué au ¹⁴C, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de ¹⁴CO₂ (14).

Demi-vie: t_{0,5}, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; la demi-vie est indépendante de la concentration.

DT₅₀ (temps de dégradation 50): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 50 %; elle est différente de la demi-vie t_{0,5} lorsque la transformation ne suit pas une cinétique du premier ordre.

DT₇₅ (temps de dégradation 75): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT₉₀ (temps de dégradation 90): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode s'applique à toutes les substances chimiques (non marquées ou radiomarquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique présentant une précision et une sensibilité suffisantes. Elle peut être appliquée aux composés légèrement volatils, non volatils, solubles ou insolubles dans l'eau. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles à partir du sol (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être maintenues dans le sol dans les conditions expérimentales de cet essai.

▼B

1.5. INFORMATIONS RELATIVES À LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique. Le marquage au ^{14}C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le marquage doit être situé dans la(les) partie(s) la(les) plus stable(s) de la molécule ⁽¹⁾. La pureté de la substance d'essai doit être d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

- a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6)
- b) solubilité dans les solvants organiques;
- c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;
- d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);
- e) stabilité chimique dans le noir (hydrolyse) (Méthode C.7);
- f) coefficient pK_a si une molécule est susceptible de subir une protonation ou une déprotonation (ligne directrice 112 de l'OCDE) (16).

Il peut également être utile de disposer d'informations relatives à la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes du sol (Méthodes d'essai C.21 et C.22) (16).

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation.

1.6. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les échantillons de sol sont traités avec la substance d'essai et incubés dans le noir dans des flacons de type biomètre ou dans des systèmes à circulation continue dans des conditions de laboratoire contrôlées (à température et humidité constantes). Après un intervalle de temps approprié, les échantillons de sol sont extraits et analysés pour mesurer la substance mère et les produits de transformation. Les produits volatils sont aussi collectés pour analyse au moyen de dispositifs d'absorption appropriés. À l'aide de produit marqué au ^{14}C , il est possible de mesurer les différents taux de minéralisation de la substance d'essai en piégeant le $^4\text{CO}_2$ dégagé, et un bilan massique, notamment la formation de résidus liés au sol, peut être établi.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. Récupération

L'extraction et l'analyse, en double exemplaire au moins, des échantillons de sol immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération concernant les étapes ultérieures des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs. Ces taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (8) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées (3).

⁽¹⁾ Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

▼B**1.7.2. Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique**

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait de sol, incubé suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

Le seuil de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et des produits de transformation doit être au moins égal à 0,01 mg.kg⁻¹ de sol (substance d'essai) ou 1 % de la dose appliquée si celle-ci est inférieure. Le seuil de quantification doit également être spécifié.

1.7.3. Précision des données de transformation

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT₅₀ et, le cas échéant, des valeurs DT₇₅ et DT₉₀.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**1.8.1. Appareils et réactifs chimiques**

Les incubateurs sont composés de circuits fermés statiques ou de systèmes à circulation continue adaptés (7) (17). Les figures 1 et 2, respectivement, présentent des exemples d'incubateur à circulation continue et de flacons de type biomètre. Les deux types d'incubateur présentent des avantages et des inconvénients (7) (17).

Matériel courant de laboratoire, notamment:

- instruments d'analyse: chromatographie gaz-liquide, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, y compris les systèmes de détection appropriés pour analyser les substances radiomarquées ou non marquées ou la méthode de dilution isotopique inverse,
- instruments destinés à l'identification (spectromètre de masse, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, HPLC-MS, RMN, etc.),
- compteur à scintillation liquide,
- appareillage d'oxydation pour la combustion des produits radioactifs,
- centrifugeuse,
- appareil d'extraction (par exemple, tubes de centrifugation pour extraction à froid et appareil pour extraction en continu sous reflux de type soxhlet),
- instrumentation pour concentrer les solutions et les extraits (évaporateur rotatif),
- bain-marie,
- mélangeurs mécaniques (pétrin, mélangeur rotatif).

▼B

Les réactifs chimiques utilisés sont, par exemple:

- NaOH, de pureté analytique, $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ou une autre base appropriée (par exemple, KOH, éthanolamine),
- H_2SO_4 , de pureté analytique, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,
- Éthylène glycol, de pureté analytique,
- matériaux d'absorption solide tels que chaux sodée et tampons de polyuréthane,
- solvants organiques, de pureté analytique, tels qu'acétone, méthanol, etc.,
- liquide de scintillation.

1.8.2. **Application de la substance d'essai**

Pour l'incorporer et la répartir dans le sol, on peut dissoudre la substance d'essai dans l'eau (désionisée ou distillée) ou, si nécessaire, dans une quantité minimale d'acétone ou d'autres solvants organiques (6) dans lesquels la substance d'essai est suffisamment soluble et stable. Toutefois, la quantité de solvant sélectionnée ne doit pas avoir une influence significative sur l'activité microbienne du sol (voir les points 1.5 et 1.9.2-1.9.3). Il convient d'éviter d'utiliser des solvants qui inhibent l'activité microbienne, comme le chloroforme, le dichlorométhane et autres solvants halogénés.

La substance d'essai peut également être ajoutée sous forme solide, mélangée avec du sable de quartz (6) ou dans un petit sous-échantillon de sol séché à l'air et stérilisé. Si la substance d'essai est ajoutée à l'aide d'un solvant, le solvant doit pouvoir s'évaporer avant que le sous-échantillon chargé soit ajouté à l'échantillon original de sol non stérile.

Pour les substances chimiques courantes, dont la principale voie de pénétration dans le sol passe par les boues d'épuration ou le traitement agricole, il convient de commencer par ajouter la substance d'essai dans la boue avant de l'introduire dans l'échantillon de sol (voir les points 1.9.2 et 1.9.3).

Il n'est pas recommandé d'utiliser systématiquement des produits formulés. Toutefois, pour les substances peu solubles, l'utilisation de produit formulé peut être une solution appropriée.

1.8.3. **Sols**

1.8.3.1. *Sélection du sol*

Pour déterminer la voie de transformation, on peut utiliser un sol représentatif; un limon sableux, un limon fin, un limon ou un sable limoneux [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)] avec un pH de 5,5-8,0, une teneur en carbone organique de 0,5-2,5 % et une biomasse microbienne d'au moins 1 % de carbone organique total est recommandée (10).

Pour les études des taux de transformation, il convient d'utiliser au moins trois sols supplémentaires représentatifs de la gamme de sols concernés. La teneur en carbone organique, le pH, la teneur en argile et la biomasse microbienne des sols doivent varier (10).

▼B

Pour tous les sols, il convient d'établir au moins les caractéristiques suivantes: texture (% sable, % limon, % argile) [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)], pH, capacité d'échange cationique, carbone organique, densité apparente, caractéristiques de rétention d'eau ⁽¹⁾ et biomasse microbienne (pour les études aérobies uniquement). Des informations complémentaires sur les propriétés du sol peuvent être utiles pour interpréter les résultats. Les méthodes recommandées dans les références (19) (20) (21) (22) (23) peuvent être utilisées pour déterminer les caractéristiques du sol. La biomasse microbienne doit être déterminée à l'aide de la méthode de respiration induite par le substrat (SIR) (25) (26) ou d'autres méthodes (20).

1.8.3.2. *Prélèvement, manipulation et stockage des sols*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement, qui englobent la localisation, le couvert végétal, les traitements aux substances chimiques, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou d'autres contaminations. Si les sols ont été traités avec la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes, ils ne doivent pas être utilisés pour les études de transformation (10) (15).

Le sol doit être fraîchement extrait du site (de l'horizon A ou de la couche supérieure de 20 cm) avec une teneur en eau facilitant le tamisage. Pour les sols autres que les sols de rizières, il faut éviter de prélever les échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (> 30 jours) de sécheresse, de gel ou d'inondations (14). Les échantillons doivent être transportés de façon à minimiser les modifications de la teneur en eau du sol et conservés dans le noir avec libre circulation d'air, dans la mesure du possible. Un sac en polyéthylène à fermeture non étanche est généralement indiqué à cet effet.

Le sol doit être traité le plus rapidement possible après le prélèvement. Il convient de retirer les gros débris végétaux, animaux et les pierres avant de passer le sol à travers un tamis de 2 mm pour retirer les petits débris de pierres, et les débris animaux et végétaux. Il convient d'éviter de sécher et de broyer le sol de manière importante avant de le tamiser (15).

Lorsqu'il est difficile de prélever des échantillons en hiver (sol gelé ou recouvert d'une couche de neige), ceux-ci peuvent être prélevés sur un lot de sol stocké dans une serre sous couvert végétal (herbe ou mélange d'herbe et de trèfle). Il est nettement préférable d'effectuer des études avec des sols qui viennent d'être extraits du site, mais si le sol prélevé et traité doit être stocké avant le début de l'étude, les conditions de stockage doivent être appropriées et leur durée doit être limitée (4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois) afin de préserver l'activité microbienne ⁽²⁾. On trouvera des instructions détaillées sur le prélèvement, la manipulation et le stockage des sols à utiliser pour les expériences de biotransformation sous les références (8) (10) (15) (26) (27).

⁽¹⁾ La caractéristique de rétention d'eau d'un sol peut être mesurée comme capacité au champ, capacité de rétention d'eau ou comme potentiel de succion (pF). Pour les explications, voir l'annexe 1. Il convient d'indiquer dans le rapport d'essai si les caractéristiques de rétention d'eau et la densité apparente des sols ont été déterminées sur des échantillons de sol non brassé ou avec des échantillons brassés (transformés).

⁽²⁾ Des résultats récents indiquent que les sols des zones tempérées peuvent également être stockés à — 20 °C pendant plus de trois mois (28) (29) sans perte significative de l'activité microbienne.

▼B

Avant son utilisation dans le cadre du présent essai, le sol traité doit être préincubé afin de permettre la germination et l'élimination des semences, et de rétablir l'équilibre du métabolisme microbien après le passage des conditions de prélèvement ou de stockage aux conditions d'incubation. Une période de préincubation de 2 à 28 jours approchant les conditions de température et d'humidité de l'essai réel est généralement indiquée (15). La durée du stockage et de la préincubation ne doit pas dépasser trois mois au total.

1.9. EXÉCUTION DE L'ESSAI**1.9.1. Conditions de l'essai****1.9.1.1. Température de l'essai**

Au cours de toute la période d'essai, les sols doivent être incubés dans le noir, à température constante, respectant les conditions climatiques dans lesquelles l'utilisation ou le rejet interviendra. Une température de 20 ± 2 °C est recommandée pour toutes les substances d'essai susceptibles d'entrer en contact avec le sol dans les climats tempérés. La température doit être enregistrée.

Pour les substances chimiques appliquées ou libérées dans les climats froids (par exemple dans les pays nordiques, pendant l'automne/hiver), des échantillons de sol supplémentaires doivent également être incubés mais à une température plus basse (par exemple à 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. Teneur en humidité

Pour les essais de transformation en milieu aérobie, la teneur en humidité du sol ⁽¹⁾ doit être ajustée et maintenue à une pF située entre 2,0 et 2,5 (3). La teneur en humidité du sol est exprimée en masse d'eau par masse de sol sec et elle doit être contrôlée régulièrement (toutes les 2 semaines par exemple) en pesant les flacons d'incubation et les pertes en eau doivent être compensées par l'adjonction d'eau (de préférence de l'eau du robinet stérilisée par filtration). Il convient de veiller à éviter ou à réduire les pertes de substance d'essai et/ou des produits de transformation par évaporation et/ou photodégradation (le cas échéant) pendant l'ajout d'eau.

Pour les essais de transformation dans des conditions anaérobies et de rizière, le sol est saturé en eau par submersion.

1.9.1.3. Conditions d'incubation aérobies

Dans les systèmes à circulation continue, les conditions aérobies sont maintenues par lessivage périodique ou par aération continue avec de l'air humidifié. Dans les flacons de type biomètre, l'échange d'air est maintenu par diffusion.

1.9.1.4. Conditions aérobies stériles

Pour obtenir des informations sur l'importance de la transformation abiotique d'une substance d'essai, les échantillons de sol peuvent être stérilisés (pour les méthodes de stérilisation, voir les références 16 et 29), traités avec une substance d'essai stérile (par exemple l'addition de solution à travers un filtre stérile) et aérés avec de l'air stérile humidifié comme décrit au point 1.9.1.3. Pour les sols de rizière, le sol et l'eau doivent être stérilisés et l'incubation doit être effectuée comme décrit au point 1.9.1.6.

⁽¹⁾ Le sol ne doit jamais être trop humide ni trop sec afin de maintenir des conditions adéquates d'aération et de nutrition de la microflore du sol. Les teneurs en eau recommandées pour une croissance microbienne optimale vont de 40 à 60 % de capacité de rétention d'eau (WHC) et de 0,1 à 0,33 bar (6). Cette fourchette est équivalente à un intervalle de pF de 2,0-2,5. L'annexe 2 présente la teneur habituelle en eau de plusieurs types de sol.

▼B1.9.1.5. *Conditions d'incubation anaérobies*

Afin de créer et de maintenir des conditions anaérobies, le sol traité avec la substance d'essai et incubé dans des conditions aérobies pendant 30 jours ou une demi-vie ou DT_{50} (si celle-ci est plus courte) est ensuite recouvert d'eau (couche de 1-3 cm d'eau) et le système d'incubation est balayé avec un gaz inerte (azote ou argon) ⁽¹⁾. Le système d'essai doit permettre de mesurer le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox et comprendre des dispositifs de piégeage des produits volatiles. Le système de type biomètre doit être fermé pour éviter toute entrée d'air par diffusion.

1.9.1.6. *Conditions d'incubation dans les sols de rizière*

Pour étudier la transformation dans les sols de rizière, le sol est recouvert d'une couche d'eau de 1-5 cm environ et la substance d'essai appliquée à la phase aqueuse ⁽⁹⁾. Une profondeur de couche de sol de 5 cm au moins est recommandée. Le système est ventilé avec de l'air comme en situation aérobie. Le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox de la couche aqueuse doivent être surveillés et enregistrés. Une période de préincubation de deux semaines au moins est nécessaire avant de commencer les études de transformation (voir le point 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Durée de l'essai*

En règle générale, les études des taux et des voies de transformation ne doivent pas dépasser 120 jours ⁽²⁾ ⁽³⁾ ⁽⁶⁾ ⁽⁸⁾, parce qu'au-delà, dans un système artificiel en laboratoire qui ne peut se reconstituer naturellement, on peut attendre une diminution de l'activité microbienne du sol avec le temps. S'il est nécessaire de caractériser la déplétion de la substance d'essai et la formation et la déplétion des principaux produits de transformation, les études peuvent être poursuivies pendant une période plus longue (de 6 à 12 mois) ⁽⁸⁾. Des périodes d'incubation plus longues doivent être justifiées dans le rapport d'essai et accompagnées de mesures de la biomasse pendant et à la fin de ces périodes.

1.9.2. **Exécution de l'essai**

On place 50 à 200 g de sol environ (sur la base du poids sec) dans chaque flacon d'incubation (voir les figures 1 et 2 à l'annexe 3) et on traite le sol avec la substance d'essai en utilisant l'une des méthodes décrites au point 1.8.2. Si l'on utilise des solvants organiques pour appliquer la substance d'essai, il convient de les éliminer du sol par évaporation. Puis, le sol est soigneusement mélangé à l'aide d'une spatule et/ou en agitant le flacon. Si l'étude est menée dans des conditions de sol de rizière, le sol et l'eau doivent être soigneusement mélangés après l'application de la substance d'essai. De petits aliquots (1 g par exemple) des sols traités doivent être analysés pour mesurer la substance d'essai afin de vérifier l'uniformité de la répartition. D'autres méthodes sont décrites ci-dessous.

⁽¹⁾ Les conditions aérobies sont prédominantes dans les sols de surface et même dans les sols subsurfaciques comme le montre un projet de recherche financé par PUE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., p. 270-277, 17-21 août 1992, Sigtuna, Suède]. Les conditions anaérobies ne peuvent se produire qu'occasionnellement sur des sols inondés après d'importantes chutes de pluie ou sur des sols de rizières submergées.

⁽²⁾ Les études aérobies doivent être terminées en moins de 120 jours sous réserve que la voie de transformation et la minéralisation se soient effectivement produites à cette date. Il est possible de mettre fin à l'essai au bout de 120 jours, ou lorsque 90 % au moins de la substance d'essai sont transformés, mais seulement s'il y a formation de 5 % de CO_2 au moins.

▼B

Le taux de traitement doit correspondre à la dose d'application la plus élevée d'un produit phytosanitaire recommandée dans les instructions d'utilisation et à l'incorporation uniforme à une profondeur appropriée dans le champ [couche supérieure du sol sur 10 cm ⁽¹⁾]. Par exemple, pour les substances chimiques appliquées sur le feuillage ou sans enfouissement dans le sol, la profondeur appropriée pour calculer la quantité de substance chimique à ajouter à chaque flacon est de 2,5 cm. Pour les substances chimiques enfouies dans le sol, la profondeur appropriée est la profondeur d'enfouissement spécifiée dans les instructions d'utilisation. Pour les substances chimiques courantes, la dose d'application doit être estimée sur la base de la voie de pénétration la plus pertinente; par exemple, lorsque les boues d'épuration sont la principale voie de pénétration dans le sol, la substance chimique doit être dosée dans la boue à une concentration correspondant à la concentration prévue et la quantité de boue ajoutée au sol doit correspondre à la charge normale en boue des sols agricoles. Si cette concentration n'est pas suffisamment élevée pour identifier les principaux produits de transformation, l'incubation d'échantillons de sol contenant des taux plus élevés peut être utile, mais il convient d'éviter des taux excessifs qui influencent les fonctions microbiennes du sol (voir les points 1.5 et 1.8.2).

Un autre moyen consiste à traiter un lot plus important (de 1 à 2 kg) de sol avec la substance d'essai, en le mélangeant soigneusement dans un mélangeur adapté puis en le transférant en petites fractions de 50 à 200 g dans les flacons d'incubation (par exemple à l'aide de répartiteurs). De petits aliquots (1 g par exemple) du lot de sol traité doivent être analysés afin de vérifier l'uniformité de la répartition de la substance d'essai. Cette procédure est préférable car elle permet une répartition plus uniforme de la substance d'essai dans le sol.

De même, les échantillons de sol non traités sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse pendant le déroulement et à la fin des essais.

Lorsque la substance d'essai est appliquée dans le sol dissous dans un (ou plusieurs) solvant(s) organique(s), des échantillons de sol traité avec la même quantité de solvant(s) sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse au début, pendant le déroulement et à la fin des essais afin de contrôler les effets du(des) solvant(s) sur la biomasse microbienne.

Les flacons contenant le sol traité sont attachés au système à circulation continue décrit à la figure 1 ou fermés par la colonne d'absorption présentée dans la figure 2 (voir l'annexe 3).

⁽¹⁾ Calcul de la concentration initiale en fonction de la superficie à l'aide de l'équation suivante:

$$C_{\text{sol}} [\text{mg}/\text{kg}_{\text{sol}}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^6 [\text{mg}/\text{kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{sol}}/\text{m}^3]}$$

C_{sol} = concentration initiale dans le sol [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

A = Taux d'application [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = épaisseur de la couche de sol du champ [m]; d = densité apparente du sol sec [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$].

En règle générale, si on applique un taux de $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, on obtient une concentration de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ environ dans une couche de 10 cm (en supposant une densité apparente de $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

▼B**1.9.3. Échantillonnage et mesures**

Les flacons d'incubation en deux exemplaires sont retirés à des intervalles appropriés et les échantillons de sol extraits à l'aide de solvants appropriés de polarité différente et analysés pour mesurer la substance d'essai et/ou les produits de transformation. Une étude bien conçue comprend un nombre suffisant de flacons de façon à pouvoir sacrifier deux flacons à chaque prélèvement. De plus, des solutions d'absorption ou des matériaux d'absorption solides sont retirés à différents intervalles de temps (tous les 7 jours au cours du premier mois et, au bout d'un mois, tous les 17 jours) pendant et à la fin de l'incubation de chaque échantillon de sol et analysés pour mesurer les produits volatils. Par ailleurs, au moins 5 points supplémentaires de prélèvement devraient être prévus en plus de l'échantillon de sol prélevé directement après application (échantillon de 0 jour). Les intervalles de temps doivent être choisis de façon à pouvoir établir la courbe de déplétion de la substance d'essai et les courbes de formation et de déplétion des produits de transformation (par exemple 0, 1, 3, 7 jours; 2, 3 semaines; 1, 2, 3 mois, etc.).

Lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C , la radioactivité non extractible est quantifiée par combustion et un bilan massique est calculé pour chaque intervalle de prélèvement.

Dans le cas de l'incubation anaérobie et des sols de rizière, la phase sol et la phase aqueuse peuvent être analysées ensemble pour mesurer la substance d'essai et les produits de transformation ou séparées par filtration ou centrifugation avant extraction et analyse.

1.9.4. Essais facultatifs

Il peut être utile d'effectuer des études aérobies non stériles à d'autres températures et humidités de sol pour estimer l'influence de la température et de l'humidité du sol sur le taux de transformation d'une substance d'essai et/ou de ses produits de transformation dans le sol.

On peut essayer d'effectuer une caractérisation plus poussée de la radioactivité non extractible en utilisant, par exemple, l'extraction par un fluide supercritique.

2. DONNÉES**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Les quantités de substance d'essai, de produits de transformation, de substances volatiles (en % uniquement) et non extractibles doivent être données en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, s'il y a lieu, en mg.kg^{-1} de sol (sur la base du poids sec de sol) à chaque intervalle de prélèvement. Pour chaque intervalle de prélèvement, un bilan massique doit être donné en pourcentage de la concentration initiale appliquée. La représentation graphique des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'estimer sa durée de demi-vie de la transformation ou sa DT_{50} . Les produits de transformation principaux doivent être identifiés et leurs concentrations doivent également être présentées graphiquement en fonction du temps afin de montrer leurs taux de formation et de déplétion. On entend par produit de transformation principal tout produit représentant > 10 % de la dose appliquée à n'importe quel moment de l'étude.

Les produits volatils piégés donnent une indication du potentiel de volatilité d'une substance d'essai et de ses produits de transformation à partir du sol.

▼B

Il est possible de déterminer avec plus de précision les demi-vies ou les valeurs DT_{50} et, s'il y a lieu, les valeurs DT_{75} et DT_{90} en utilisant des méthodes de calcul fondées sur des modèles cinétiques appropriés. La durée de demi-vie et les valeurs DT_{50} doivent être notées dans le rapport avec la description du modèle cinétique utilisé, l'ordre de la cinétique et le coefficient de détermination (r^2). La cinétique du premier ordre est préférable sauf si $r^2 < 0,7$. Si nécessaire, les calculs doivent aussi être appliqués aux principaux produits de transformation. Des exemples des modèles appropriés sont décrits sous les références 31 à 35.

Dans le cas des études de taux effectuées à des températures différentes, les taux de transformation doivent être décrits comme fonction de la température à l'intérieur de l'intervalle de température de l'expérience en appliquant la formule de la relation d'Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

où $\ln A$ et B sont des constantes de régression, respectivement, l'intersection et la pente de la droite d'interpolation produite par régression linéaire de $\ln k$ par rapport à $1/T$, où k est la constante de vitesse à la température T et T la température en degrés Kelvin. Il convient de prendre soin à l'intervalle limité de température à l'intérieur de laquelle la relation d'Arrhenius est valable dans le cas où la transformation dépend de l'activité microbienne.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Bien que les études soient effectuées dans un système artificiel en laboratoire, les résultats permettent d'estimer le taux de transformation de la substance d'essai ainsi que les taux de formation et de déplétion des produits de transformation dans des conditions de terrain (36) (37).

L'étude des voies de transformation d'une substance d'essai donne des informations sur la façon dont la structure de la substance appliquée est modifiée dans le sol par des réactions chimiques et microbiennes.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale [indiquant la(les) position (s) du(des) marquage(s) lorsqu'on utilise un produit radiomarqué] et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir le point 1.5),
- pureté (impuretés) de la substance d'essai,
- pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (s'il y a lieu).

Substances de référence:

- nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier le produit de transformation.

Sol d'essai:

- détails du site de prélèvement,
- date et procédure d'échantillonnage du sol,

▼B

- propriétés des sols: pH, teneur en carbone organique, texture (% sable, % limon, % argile), capacité d'échange cationique, densité apparente, caractéristique de rétention d'eau, et biomasse microbienne,
- durée et conditions de stockage du sol (s'il y a lieu).

Conditions d'essai:

- dates de réalisation des études,
- quantité de substance d'essai appliquée,
- solvants utilisés et méthode d'application de la substance d'essai,
- poids de sol traité initialement et prélevé à chaque intervalle pour analyse,
- description du système d'incubation utilisé,
- débit d'écoulement de l'air (pour les systèmes à circulation continue uniquement),
- température au début de l'expérience,
- teneur en humidité du sol pendant l'incubation,
- biomasse microbienne au début, pendant le déroulement et à la fin des études aérobies,
- pH, concentration en oxygène et potentiel redox au début, pendant le déroulement et à la fin des études anaérobies et des sols de rizière,
- méthode(s) d'extraction,
- méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et des principaux produits de transformation dans le sol et matériau d'absorption,
- nombre de réplicats et nombre de témoins.

Résultats:

- résultat de la détermination de l'activité microbienne,
- reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,
- taux de récupération (les pourcentages acceptables pour que l'étude soit valable sont présentés au point 1.7.1),
- tableaux de résultats exprimés en % de la dose initiale appliquée et, s'il y a lieu, en mg.kg^{-1} de sol (sur la base de poids sec),
- bilan massique pendant et à la fin des études,
- caractérisation de la radioactivité non extractible (liée) ou des résidus dans le sol,
- quantification du CO_2 dégagé et des autres composés volatiles,
- graphes représentant la concentration de la substance d'essai dans le sol en fonction du temps et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation,
- demi-vie ou DT_{50} , DT_{75} et DT_{90} pour la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation, ainsi que les limites de confiance,

▼B

- estimation de la vitesse de dégradation abiotique dans des conditions stériles,
- évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation,
- voies de transformation proposées, s'il y a lieu,
- discussion et interprétation des résultats,
- données brutes (chromatogramme des échantillons, calcul des vitesses de transformation des échantillons et moyens utilisés pour identifier les produits de transformation).

4. **RÉFÉRENCES**

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Union européenne (UE) (1995). Directive 95/36/CE de la Commission du 14 juillet 1995 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe II, partie A, et annexe III, partie A: Devenir et comportement dans l'environnement.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation Systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF — Japon 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italie, 18-20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 123-157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts: Non extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (14) Ligne directrice de l'OCDE 304 A: Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

▼B

- (15) ISO 10381-6 (1993). Qualité des sols — Échantillonnage — Partie 6: Guide du prélèvement, de la manipulation et du stockage des sols pour l'évaluation des processus microbiens en laboratoire.
- (16) Annexe V de la directive 67/548/CEE.
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO Systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- (19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Kliite, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (21) *ISO Standard Compendium Environment* (1994). *Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Schefier, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, p. 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). *Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method*.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, p. 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio- transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, p. 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, p. 197-200.
- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallyl im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, p. 141-146.

▼B

- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 181-199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., p. 135-172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide résidus. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, p. 188-204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, p. 47-60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, p. 1032-1041.
- (37) Hurler K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 83-122.



Annexe 1

SUCCION, CAPACITÉ AU CHAMP (FC) ET CAPACITÉ DE RÉTENTION D'EAU (WHC) ⁽¹⁾

| Hauteur de la colonne d'eau [cm] | pF ^(a) | bar ^(b) | Remarques |
|----------------------------------|-------------------|---------------------|--|
| 10 ⁷ | 7 | 10 ⁴ | Sol sec |
| 1,6 · 10 ⁴ | 4,2 | 16 | Point de flétrissement |
| 10 ⁴ | 4 | 10 | |
| 10 ³ | 3 | 1 | |
| 6 · 10 ² | 2,8 | 0,6 | |
| 3,3 · 10 ² | 2,5 | 0,33 ^(c) | Échelle de la capacité au champ ^(d) |
| 10 ² | 2 | 0,1 | |
| 60 | 1,8 | 0,06 | |
| 33 | 1,5 | 0,033 | |
| 10 | 1 | 0,01 | Capacité de rétention d'eau (approximation) |
| 1 | 0 | 0,001 | Sol saturé en eau |

^(a) pF = log de la colonne d'eau en cm.

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

^(c) Correspond à une teneur en eau approximative de 10 % dans le sable, de 35 % dans le limon et de 45 % dans l'argile.

^(d) La capacité au champ n'est pas constante mais varie selon le type de sol de pF 1,5 à 2,5.

La *succion* est mesurée en cm de colonne d'eau ou en bar. Comme l'échelle de valeur de la succion est très large, celle-ci est exprimée simplement en pF, qui est égal au logarithme de la colonne d'eau en cm.

La *capacité au champ* (FC) est définie comme la quantité d'eau qui peut être stockée contre la gravité par un sol naturel 2 jours après une longue période de pluie ou après une irrigation suffisante. Elle est déterminée dans un sol non brassé in situ dans le champ. Cette mesure ne peut donc pas s'appliquer aux échantillons de sol brassé. Les valeurs de capacité au champ déterminées dans les sols brassés peuvent présenter une variabilité systématique importante.

La *capacité de rétention d'eau* (WHC) est déterminée en laboratoire avec un sol non brassé et un sol brassé en saturant une colonne de sol avec de l'eau par capillarité. Elle est particulièrement utile pour les sols brassés et peut être jusqu'à 30 % supérieure à la capacité au champ (1). Elle est également plus facile à déterminer expérimentalement que des valeurs de capacité au champ fiables.

Notes

⁽¹⁾ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B*Annexe 2***TENEUR EN HUMIDITÉ (g d'eau pour 100 g de sol sec) DE DIFFÉRENTS TYPES DE SOL
PROVENANT DE DIFFÉRENTS PAYS**

| Type de sol | Pays | Teneur en humidité à | | |
|----------------|------------|----------------------|----------|----------|
| | | WHC ⁽¹⁾ | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Sable | Allemagne | 28,7 | 8,8 | 3,9 |
| Sable limoneux | Allemagne | 50,4 | 17,9 | 12,1 |
| Sable limoneux | Suisse | 44,0 | 35,3 | 9,2 |
| Limon fin | Suisse | 72,8 | 56,6 | 28,4 |
| Limon argileux | Brésil | 69,7 | 38,4 | 27,3 |
| Limon argileux | Japon | 74,4 | 57,8 | 31,4 |
| Limon sableux | Japon | 82,4 | 59,2 | 36,0 |
| Limon fin | États-Unis | 47,2 | 33,2 | 18,8 |
| Limon sableux | États-Unis | 40,4 | 25,2 | 13,3 |

⁽¹⁾ Capacité de rétention d'eau

▼B

Annexe 3

Figure 1

Exemple d'appareil à circulation continue pour étudier la transformation des substances chimiques dans le sol ⁽¹⁾ ⁽²⁾

- | | | |
|--|--|--|
| 1: robinet à pointeau | 4: flacon pour le métabolisme du sol (saturé en eau uniquement pour les conditions anaérobies et de rizière) | 7, 8: piège d'hydroxyde de sodium pour le CO ₂ & autres acides volatils |
| 2: bouteille de lavage du gaz contenant de l'eau | 5: piège à éthylène glycol pour les composés volatils organiques | 9: débitmètre |
| 3: ultramembrane (conditions stériles uniquement), taille de pore 0,2 µm | 6: piège à acide sulfurique pour les composés alcalins volatils | |

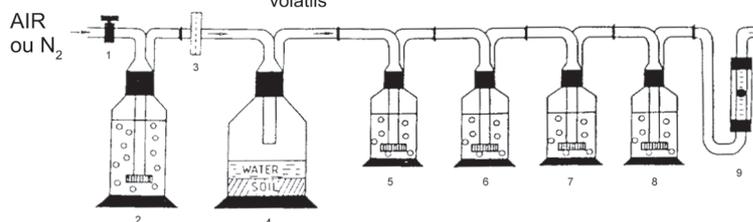
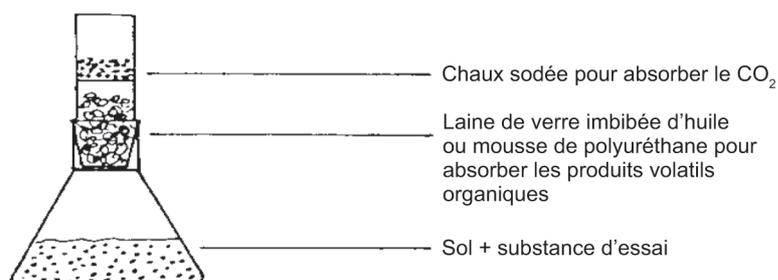


Figure 2

Exemple de flacon de type biomètre pour l'étude de la transformation des substances chimiques dans le sol ⁽³⁾

⁽¹⁾ Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 123-157.

⁽²⁾ Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

⁽³⁾ Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B**C.24. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LES SYSTÈMES SÉDIMENTAIRES AQUATIQUES****1. MÉTHODE**

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 308 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les substances chimiques peuvent pénétrer dans les eaux de surface peu ou très profondes par des voies telles que l'application directe, la déperdition lors de l'épandage, le ruissellement, le drainage, l'élimination des déchets, les effluents industriels, domestiques ou agricoles et le dépôt atmosphérique. La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour évaluer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques organiques dans les systèmes sédimentaires aquatiques. Elle s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6). Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, en Italie, en 1995 (7), a défini notamment le nombre et le type de sédiments à utiliser dans le cadre de cet essai. Il a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sédiments, sur la base des lignes directrices de l'ISO (8). Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont introduites directement dans l'eau ou qui sont susceptibles de pénétrer dans le milieu aquatique par les voies décrites ci-dessus.

La phase aqueuse supérieure des systèmes sédimentaires aquatiques présente souvent des conditions aérobies. La couche superficielle du sédiment peut être aérobie ou anaérobie, alors que, en profondeur, le sédiment est généralement anaérobie. Afin de tenir compte de toutes ces possibilités, le présent document décrit des essais aérobies et anaérobies. L'essai aérobie simule une colonne d'eau aérobie sur une couche de sédiment aérobie et une sous-couche avec un gradient anaérobie. L'essai anaérobie simule un système eau-sédiment complètement anaérobie. Si, selon les circonstances, il est nécessaire de s'écarter sensiblement de ces recommandations, par exemple en utilisant des carottes de sédiment intact ou des sédiments qui ont pu être exposés à la substance d'essai, il existe d'autres méthodes à cette fin (9).

1.2. DÉFINITIONS

Il convient d'utiliser dans tous les cas les unités standard internationales (SI).

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation: toutes les substances résultant des réactions de transformation biotiques et abiotiques de la substance d'essai, et notamment le CO₂ et les résidus liés.

Résidus liés: les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous la forme de la substance mère ou de ses métabolite(s). La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par les méthodes d'extraction qui modifient la matrice et des techniques analytiques sophistiquées. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente ionique, par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (10) [modifié d'après l'UICPA 1984 (11)].

▼B

Transformation aérobie: (oxydation): réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (12).

Transformation anaérobie: (réduction): réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (12).

Eaux naturelles: eaux superficielles provenant de mares, rivières, fleuves, etc.

Sédiment: mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote et à masse moléculaire élevée. Il est déposé par les eaux naturelles avec lesquelles il forme une interface.

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé radiomarqué, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé ou réduit quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de ¹⁴CO₂ ou de ¹⁴CH₄, respectivement.

Demi-vie, t_{0,5}, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; elle est indépendante de la concentration initiale.

DT₅₀ (temps de dégradation 50): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 50 %.

DT₇₅ (temps de dégradation 75): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT₉₀ (temps de dégradation 90): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4. INFORMATIONS RELATIVES À LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation, bien qu'il soit préférable d'utiliser du matériel marqué. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique, le marquage au ¹⁴C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P, peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le-marquage doit être situé dans la partie(s) la plus stable de la molécule⁽¹⁾. La substance d'essai doit avoir une pureté chimique et/ou radiochimique d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

- a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6);
- b) solubilité dans les solvants organiques;
- c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;

⁽¹⁾ Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

▼B

- d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);
- e) coefficient d'adsorption (K_d , K_r ou K_{oc} , s'il y a lieu) (Méthode C.18);
- f) hydrolyse (Méthode C.7);
- g) constante de dissociation (pK_a) [ligne directrice 112 de l'OCDE] (13);
- h) structure chimique de la substance d'essai et position des marqueurs isotopiques, s'il y a lieu.

Note: Il convient d'indiquer la température à laquelle ces mesures ont été effectuées.

Il peut également être utile de disposer d'informations sur la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes, sur la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque, ainsi que sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol.

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation dans l'eau et dans les sédiments (voir le point 1.7.2).

1.5. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode décrite ici emploie un système sédimentaire aquatique aérobie et anaérobie (voir l'annexe 1) qui permet:

- i) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment;
- ii) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment;
- iii) de mesurer le taux de minéralisation de la substance d'essai et/ou de ses produits de transformation (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C);
- iv) d'identifier et de quantifier les produits de transformation dans les phases aqueuse et sédimentaire et notamment le bilan massique (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée);
- v) de mesurer la répartition de la substance d'essai et de ses produits de transformation entre les deux phases pendant une période d'incubation dans le noir (pour éviter, par exemple, la prolifération d'algues) à température constante. Les durées de demi-vie, les valeurs DT_{50} , DT_{75} et DT_{90} sont déterminées lorsque les données le permettent, mais elles ne doivent pas être extrapolées bien au-delà de la période expérimentale (voir le point 1.2).

Au moins deux sédiments et les phases aqueuses associées sont nécessaires pour les études aérobies et anaérobies respectivement (7). Il peut toutefois être nécessaire dans certains cas d'utiliser plus de deux sédiments aquatiques, par exemple, pour une substance chimique pouvant être présente dans l'eau douce et/ou le milieu marin.

▼B

1.6. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode peut être appliquée aux substances chimiques (marquées ou non marquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique de précision et de sensibilité suffisantes. Elle s'applique à des composés faiblement volatils, non volatils, hydrosolubles ou peu hydrosolubles. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles dans l'eau (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être gardées dans l'eau et/ou le sédiment dans les conditions expérimentales de cet essai.

La méthode a été appliquée jusqu'ici pour étudier la transformation des substances chimiques dans les eaux douces et dans les sédiments, mais, en principe, elle peut également être appliquée aux systèmes estuariens/marins. Elle n'est pas adaptée à la simulation des conditions de l'eau courante (rivières) ou de pleine mer.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'extraction et l'analyse, au moins en double exemplaire, des échantillons d'eau et de sédiment immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération des stades ultérieurs des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs (lorsqu'on utilise une substance marquée). Les taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (6) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées.

1.7.2. **Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique**

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait d'échantillons d'eau ou de sédiments, incubés suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

La limite de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et ses produits de transformation doit être au moins égale à 0,01 mg.kg⁻¹ dans l'eau ou le sédiment (substance d'essai) ou à 1 % de la quantité initiale appliquée à un système d'essai si cette quantité est inférieure. La limite de quantification doit également être spécifiée.

1.7.3. **Précision des données de transformation**

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations appropriées sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT₅₀ et, le cas échéant, des valeurs DT₇₅ et DT₉₀.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Système et appareillage d'essai**

L'étude doit être effectuée dans des récipients en verre (bouteilles, tubes de centrifugation), à moins que les informations préliminaires (coefficient de partage n-octanol/eau, données de sorption, etc.) indiquent que la substance d'essai risque d'adhérer au verre, auquel cas on peut envisager l'utilisation d'un autre matériau (Téflon). Lorsque l'on sait que la substance d'essai adhère au verre, il est possible de contourner le problème en utilisant l'une des méthodes suivantes:

▼B

- déterminer la masse de la substance d'essai et de ses produits de transformation sorbés sur le verre,
- veiller à nettoyer toute la verrerie à l'aide d'un solvant à la fin de l'essai,
- utilisation de produits formulés (voir également le point 1.9.2),
- utilisation d'une quantité croissante de cosolvant pour ajouter la substance d'essai au système; si l'on utilise un cosolvant, celui-ci ne doit pas entraîner de réaction de solvolysé avec la substance d'essai.

Des exemples d'appareillage d'essai courant (systèmes à flux continu et biomètres) sont présentés dans les annexes 2 et 3, respectivement (14). On trouvera d'autres systèmes d'incubation sous la référence 15. L'appareil utilisé pour l'expérience doit permettre l'échange d'air ou d'azote et le piégeage des produits volatils. Les dimensions de l'appareillage doivent permettre de satisfaire aux exigences de l'essai (voir le point 1.9.1). La ventilation peut être effectuée soit par léger barbotage soit en faisant circuler de l'air ou de l'azote à la surface de l'eau. Dans ce cas, il est conseillé de remuer doucement la surface de l'eau pour obtenir une meilleure répartition de l'oxygène ou de l'azote dans l'eau. Il ne faut pas utiliser d'air sans CO₂ car cela pourrait entraîner une augmentation du pH de l'eau. Dans les deux cas, il n'est pas souhaitable de toucher au sédiment et il convient de l'éviter dans toute la mesure du possible. Les substances chimiques faiblement volatiles doivent être testées dans un système de type biomètre en remuant légèrement la surface de l'eau. Des récipients fermés avec un espace libre d'air atmosphérique ou d'azote et des fioles à l'intérieur pour le piégeage des produits volatils peuvent également être utilisés (16). Un bon échange du gaz de surface est nécessaire dans l'essai aérobie afin de compenser la consommation d'oxygène par la biomasse.

La liste non restrictive des pièges adaptés à la collecte des produits de transformation volatils est la suivante: solutions à 1 mol.dm⁻³ d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium pour le dioxyde de carbone ⁽¹⁾ et éthylène glycol, éthanolamine ou 2 % paraffine dans le xylène pour les composés organiques. Les produits volatils formés en anaérobie, comme le méthane, peuvent être récupérés, par exemple, à l'aide de tamis moléculaires. Ces produits volatils peuvent être brûlés, par exemple, en CO₂ en faisant passer le gaz à travers un tube de quartz rempli de CuO à la température de 900 °C et en piégeant le CO₂ formé dans une colonne d'absorption contenant un produit alcalin (17).

Des instruments de laboratoire pour l'analyse chimique de la substance d'essai et des produits de transformation sont nécessaires [chromatographie gaz-liquide (GLQ), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince (TLC), spectroscopie de masse (MS), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), résonance magnétique nucléaire (RMN), etc.], ainsi que, le cas échéant, des dispositifs de détection des substances chimiques radio-marquées ou non marquées. Lorsqu'on utilise des substances radio-marquées, un compteur à scintillation liquide et un appareil d'oxydation pour la combustion (pour la combustion des échantillons de sédiment avant l'analyse de radioactivité) sont également nécessaires.

D'autres équipements courants de laboratoire peuvent s'avérer nécessaires selon le cas pour effectuer des analyses physico-chimiques et biologiques (voir le tableau 1 du point 1.8.2.2), ainsi que de la verrerie, des produits chimiques et des réactifs.

⁽¹⁾ Comme ces solutions d'absorption alcalines absorbent également le dioxyde de carbone de l'air de ventilation et de l'air formé par la respiration dans les expériences aérobies, il convient de les changer à intervalles réguliers afin d'éviter leur saturation et par conséquent la perte de leur capacité d'absorption.

▼B**1.8.2. Sélection et nombre de sédiments aquatiques**

Les sites de prélèvement doivent être choisis en fonction de la finalité de l'essai dans une situation donnée. Pour choisir les sites de prélèvement, il convient de prendre en compte l'historique des éventuels apports agricoles, industriels ou domestiques dans le bassin versant et les eaux en amont. Les sédiments ne doivent pas être utilisés s'ils ont été contaminés par la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes.

1.8.2.1. Sélection des sédiments

On utilise généralement deux sédiments pour les études aérobies (7). Les deux sédiments sélectionnés doivent différer en texture et en teneur en carbone organique. Un sédiment doit avoir une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, et l'autre doit avoir une teneur en carbone organique peu élevée (0,5-2,5 %) et une texture grossière. La différence de teneur en carbone organique doit être normalement égale ou supérieure à 2 %. On entend par «texture fine» une teneur en [argile + limon] ⁽¹⁾ > 50 % et par «texture grossière» une teneur en [argile + limon] < 50 %. La différence de teneur [argile + limon] entre les deux sédiments doit être normalement égale ou supérieure à 20 %. Dans le cas où des substances chimiques risquent d'entrer également en contact avec les eaux de mer, au moins un des deux systèmes eau-sédiment doit être d'origine marine.

Pour l'étude strictement anaérobie, deux échantillons de sédiments (ainsi que la phase aqueuse associée) doivent être prélevés dans les zones anaérobies des systèmes à eaux de surface (7). Les sédiments comme les phases aqueuses doivent être manipulés et transportés avec précaution en évitant tout contact avec l'oxygène.

D'autres paramètres peuvent présenter de l'importance dans la sélection des sédiments et ils doivent être envisagés cas par cas. Par exemple, le pH des sédiments est important pour tester les substances chimiques dont la transformation et/ou la sorption peuvent être dépendantes du pH. La dépendance au pH de la sorption peut être une conséquence du pK_a de la substance d'essai.

1.8.2.2. Caractérisation des échantillons eau-sédiment

Les paramètres clés qui doivent être mesurés et notés dans le rapport (en indiquant la méthode utilisée) pour l'eau et pour le sédiment, ainsi que l'étape de l'essai à laquelle ces paramètres doivent être déterminés, sont résumés dans le tableau ci-dessous. Pour information, les méthodes de détermination de ces paramètres sont fournies sous les références (18) (19) (20) (21).

Par ailleurs, il peut être nécessaire de mesurer et d'enregistrer d'autres paramètres selon le cas [eau douce: particules, alcalinité, dureté, conductivité, NO₃/PO₄ (rapport et valeurs individuelles)]; pour les sédiments: capacité d'échange cationique, capacité de rétention d'eau, carbonate, azote total et phosphore; pour les systèmes marins: salinité]. Il peut également être utile d'analyser les sédiments et l'eau pour mesurer le nitrate, le sulfate, le fer biodisponible, et d'autres accepteurs d'électrons peuvent aussi être utiles pour évaluer les conditions redox, notamment en ce qui concerne la transformation anaérobie.

⁽¹⁾ [Argile + limon] est la fraction minérale du sédiment de granulométrie < 50 µm.

▼B

Paramètres mesurés pour la caractérisation des échantillons d'eau et de sédiment (7) (22) (23)

| Paramètre | Étape de la procédure d'essai | | | | | |
|---|-------------------------------|-------------------|--------------------------|------------------|-----------------|---------------------|
| | prélèvement sur site | post-manipulation | début de l'acclimatation | début de l'essai | pendant l'essai | à la fin de l'essai |
| Eau | | | | | | |
| Origine/source | x | | | | | |
| Température | x | | | | | |
| pH | x | | x | x | x | x |
| Carbone organique total | | | x | x | | x |
| Concentration O ₂ * | x | | x | x | x | x |
| Potentiel redox* | | | x | x | x | x |
| Sédiment | | | | | | |
| Origine/source | x | | | | | |
| Profondeur de la couche | x | | | | | |
| pH | | x | x | x | x | x |
| Répartition de la taille des particules | | x | | | | |
| Carbone organique total | | x | x | x | | x |
| Biomasse microbienne (**) | | x | | x | | x |
| Potentiel redox (*) | Observation (couleur/odeur) | | x | x | x | x |

(*) Selon des résultats récents, les mesures des concentrations d'oxygène dans l'eau et des potentiels redox n'ont de valeur ni mécanique ni prédictive en ce qui concerne la croissance et le développement de colonies microbiennes dans les eaux superficielles (24) (25). La détermination de la demande biochimique en oxygène (lors du prélèvement, au début et à la fin de l'essai) et des concentrations de micro/macroéléments nutritifs Ca, Mg et Mn (au début et à la fin de l'essai) dans l'eau et la mesure du N total et du P total dans les sédiments (lors du prélèvement et à la fin de l'essai) peuvent être de meilleurs outils pour interpréter et évaluer les taux et les voies de biotransformation aérobie.

(**) Méthode du taux de respiration microbienne (26), méthode de fumigation (27) ou mesures de numération (bactéries, actinomycètes, champignons et colonies totales) pour les études aérobies; taux de méthanogenèse pour les études anaérobies.

1.8.3. Prélèvement, manipulation et stockage

1.8.3.1. Prélèvement

Il convient de se référer au projet de ligne directrice ISO sur l'échantillonnage des fonds sédimentaires (8) pour prélever les échantillons de sédiment. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés sur la totalité de la couche supérieure de 5 à 10 cm du sédiment. L'eau correspondante doit être collectée sur le même site ou dans le même lieu et en même temps que le sédiment. Pour l'étude anaérobie, le sédiment et l'eau correspondante doivent être prélevés et transportés en évitant tout contact avec l'oxygène (28) (voir le point 1.8.2.1). Quelques dispositifs d'échantillonnage sont décrits dans la littérature (8) (23).

▼B1.8.3.2. *Manipulation*

Le sédiment est séparé de l'eau par filtration et passé au travers d'un tamis de 2 mm en utilisant l'eau excédentaire prélevée sur le même site qui est ensuite éliminée. Des quantités connues de sédiments et d'eau sont ensuite mélangées dans le rapport désiré (voir le point 1.9.1) dans des flacons d'incubation et préparées pour la période d'acclimatation (voir le point 1.8.4). Pour l'étude anaérobie, toutes les étapes de la manipulation doivent être effectuées en l'absence d'oxygène (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Stockage*

Il est vivement recommandé d'utiliser des sédiments et de l'eau fraîchement prélevés, mais si le stockage est nécessaire, le sédiment et l'eau doivent être tamisés comme décrit ci-dessus et stockés ensemble, recouverts d'eau (couche d'eau de 6-10 cm), dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C⁴ pendant une durée maximale de quatre semaines (7) (8) (23). Les échantillons destinés aux études aérobies doivent être stockés en laissant un accès libre à l'air (dans des récipients ouverts), alors que les échantillons destinés aux études anaérobies doivent être conservés en l'absence d'oxygène. Il ne faut pas que le sédiment et l'eau soient congelés ni que le sédiment sèche pendant le transport et le stockage.

1.8.4. **Préparation des échantillons de sédiment/eau pour l'essai**

Une période d'acclimatation doit être respectée avant d'ajouter la substance d'essai, au cours de laquelle chaque échantillon de sédiment/eau est placé dans le récipient d'incubation à utiliser dans l'essai principal, et l'acclimatation est réalisée exactement dans les mêmes conditions que l'incubation de l'essai (voir le point 1.9.1). La période d'acclimatation est le temps nécessaire pour atteindre une stabilité suffisante du système, en termes de pH, de concentration de l'oxygène dans l'eau, de potentiel redox du sédiment et de l'eau, et de séparation macroscopique des phases. La période d'acclimatation doit durer normalement de une à deux semaines et elle ne doit pas excéder quatre semaines. Le résultat des déterminations effectuées pendant cette période doit être enregistré.

1.9. **RÉALISATION DE L'ESSAI**1.9.1. **Conditions de l'essai**

L'essai doit être effectué dans le dispositif d'incubation (voir le point 1.8.1) avec un rapport de volume eau/sédiment situé entre 3:1 et 4:1, et une couche sédimentaire de 2,5 cm (\pm 0,5 cm).⁽¹⁾ On recommande une quantité minimale de 50 g de sédiment (sur une base de poids sec) par récipient d'incubation.

L'essai doit être effectué dans le noir à température constante dans la fourchette de 10 à 30 °C. La température indiquée est de 20 ± 2 °C. Le cas échéant, une température supplémentaire plus basse (10 °C par exemple) peut être envisagée selon le cas, en fonction de l'information que l'on souhaite retirer de l'essai. La température d'incubation doit être surveillée et enregistrée.

⁽¹⁾ Selon des études récentes, un stockage à 4 °C peut entraîner une diminution de la teneur en carbone organique du sédiment, ce qui risque d'entraîner une diminution de l'activité microbienne (34).

▼B**1.9.2. Traitement et application de la substance d'essai**

Une seule concentration d'essai de la substance chimique est utilisée ⁽¹⁾ Pour les produits phytosanitaires appliqués directement dans le milieu aquatique, le dosage maximal indiqué sur le mode d'emploi doit être pris comme taux maximal d'application calculé sur la base de la surface de l'eau dans le récipient d'essai. Dans tous les autres cas, la concentration à utiliser doit s'appuyer sur les estimations des émissions dans l'environnement. Il convient de veiller à appliquer une concentration de substance d'essai adéquate afin de caractériser la voie de transformation et la formation et le déclin des produits de transformation. Il peut être nécessaire d'appliquer des doses plus élevées (10 fois par exemple) dans le cas où les concentrations de la substance d'essai sont proches de la limite de détection au début de l'étude et/ou les principaux produits de transformation n'ont pas pu être facilement détectés à un taux égal à 10 % du taux d'application de la substance d'essai. Toutefois, si des concentrations d'essai plus élevées sont utilisées, celles-ci ne doivent pas avoir un effet négatif important sur l'activité microbienne du système eau-sédiment. Afin d'obtenir une concentration constante de la substance d'essai dans des récipients de dimensions différentes, il peut être indiqué d'ajuster la quantité de produit appliqué, en fonction de la profondeur de la colonne d'eau dans le récipient par rapport à la profondeur de l'eau dans le champ (que l'on suppose égale à 100 cm, mais on peut prendre une autre profondeur comme base). Voir l'annexe 4 pour un exemple de calcul.

Théoriquement, la substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans la phase aqueuse du système d'essai. S'il n'est pas possible de procéder autrement, on peut utiliser de faibles quantités de solvants miscibles avec l'eau (comme l'acétone ou l'éthanol) pour appliquer et répartir la substance d'essai, mais ce solubilisant ne doit pas dépasser 1 % v/v ni avoir d'effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai. La solution aqueuse de la substance d'essai doit être préparée avec soin — afin d'assurer une homogénéité totale, on peut effectuer un prémélange et utiliser des colonnes de générateur. Après l'addition de la solution aqueuse au système d'essai, il est recommandé de remuer doucement la phase aqueuse en brassant le moins possible le sédiment.

Il n'est pas recommandé d'utiliser de manière routinière des produits formulés car les ingrédients de formulation risquent d'affecter la répartition de la substance d'essai et/ou des produits de transformation entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire. Toutefois, dans le cas de substances peu solubles dans l'eau, l'utilisation de matériau formulé peut être une solution de remplacement appropriée.

Le nombre de récipients d'incubation dépend du nombre de temps de prélèvement (voir le point 1.9.3). Un nombre suffisant de systèmes d'essai doit être prévu de façon à pouvoir sacrifier deux systèmes à chaque temps de prélèvement. Lorsqu'on utilise des unités témoins de chaque système sédimentaire aquatique, ces unités ne doivent pas être traitées avec la substance d'essai. Les unités témoins peuvent être utilisées pour déterminer la biomasse microbienne du sédiment et le carbone organique total de l'eau et du sédiment à la fin de l'étude. Deux unités témoins (une unité de chaque sédiment aquatique) peuvent être utilisées pour surveiller les paramètres requis dans le sédiment et dans l'eau pendant la période d'acclimatation (voir le tableau du point 1.8.2.2). Deux témoins supplémentaires doivent être ajoutés lorsque la substance d'essai est appliquée au moyen d'un solvant afin de mesurer les effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai.

⁽¹⁾ Il peut être utile d'effectuer un essai avec une deuxième concentration pour les substances chimiques qui atteignent les eaux superficielles par différentes voies d'entrée, ce qui entraîne des concentrations très différentes, dans la mesure où la concentration la plus faible peut être analysée avec une précision suffisante.

▼B**1.9.3. Durée de l'essai et échantillonnage**

L'expérience ne doit pas durer plus de 100 jours (6), et elle doit se poursuivre jusqu'à ce que les voies de dégradation et le profil de répartition eau/sédiment se soient établis ou lorsque 90 % de la substance d'essai s'est dissipée par transformation et/ou volatilisation. Le nombre de temps de prélèvement doit être au moins égal à six (y compris le temps zéro), et une étude préliminaire facultative (voir le point 1.9.4) est effectuée pour déterminer le régime de prélèvement et la durée de l'essai, à moins que l'on ne dispose de données suffisantes sur la substance d'essai d'après les études antérieures. Pour les substances hydrophobes, il peut être nécessaire d'effectuer des points de prélèvement complémentaires pendant la période initiale afin de déterminer le taux de répartition entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire.

À chaque temps de prélèvement, les récipients d'incubation (réplicats) sont retirés pour analyse. Le sédiment et l'eau qui le recouvre sont analysés séparément⁽¹⁾. L'eau de surface doit être retirée avec précaution en évitant autant que possible de toucher au sédiment. L'extraction et la caractérisation de la substance d'essai et des produits de transformation doivent suivre les procédures analytiques appropriées. Il faut prendre soin d'éliminer les matières adsorbées sur les parois du récipient d'incubation et dans les tuyaux utilisés pour piéger les produits volatils.

1.9.4. Essai préliminaire facultatif

S'il n'est pas possible de prévoir la durée et le régime d'échantillonnage à partir d'autres études analogues sur la substance d'essai, il peut être indiqué d'effectuer un essai préliminaire, dans les mêmes conditions d'essai que les conditions proposées pour l'étude définitive. Si cet essai préliminaire est effectué, les conditions expérimentales et les résultats de l'essai doivent être décrits brièvement.

1.9.5. Mesures et analyse

La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque temps de prélèvement dans l'eau et le sédiment doit être mesurée et enregistrée (en concentration et en pourcentage de la substance appliquée). En règle générale, tout produit de transformation détecté à > 10 % de la radioactivité totale appliquée au système eau/sédiment, quel que soit le temps de prélèvement, doit être identifié, à moins d'une justification suffisante. Les produits de transformation dont les concentrations sont en augmentation constante pendant la durée de l'étude doivent également être identifiés, même si leurs concentrations ne dépassent pas les limites indiquées ci-dessus, car cela peut indiquer une persistance. Des justifications doivent être fournies dans le rapport.

Les résultats des systèmes de piégeage des gaz/volatils (CO₂ et autres, à savoir les composés organiques volatils) doivent être enregistrés à chaque temps de prélèvement. Les taux de minéralisation doivent être enregistrés. Les résidus (liés) non extractibles dans le sédiment doivent être notés à chaque temps de prélèvement.

⁽¹⁾ Dans le cas où les produits de transformation anaérobie peuvent se réoxyder très rapidement, les conditions anaérobies doivent être maintenues pendant l'échantillonnage et l'analyse.

▼B**2. DONNÉES****2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Le bilan massique total ou la récupération (voir le point 1.7.1) de la radioactivité ajoutée doit être calculé à chaque temps de prélèvement. Les résultats doivent être transcrits en pourcentage de radioactivité ajoutée. La répartition de la radioactivité entre l'eau et le sédiment doit être transcrite sous la forme de concentration et de pourcentage, à chaque temps de prélèvement.

La demi-vie, les valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai doivent être calculées avec leurs limites de confiance (voir le point 1.7.3). Différents outils d'évaluation permettent d'obtenir des informations sur le taux de dégradation de la substance d'essai dans l'eau et le sédiment. Il est possible d'appliquer des cinétiques du pseudo premier ordre, des techniques d'interpolation empiriques utilisant des solutions graphiques ou numériques ou d'autres méthodes d'évaluation utilisant par exemple des modèles à un ou plusieurs compartiments. On trouvera plus de détails dans la littérature spécialisée (35) (36) (37).

Toutes les méthodes ont leurs avantages et leurs inconvénients et leur complexité varie considérablement. L'hypothèse d'une cinétique du premier ordre peut être une simplification trop poussée des processus de dégradation et de répartition, mais cette hypothèse, lorsque c'est possible, donne un terme (la constante de vitesse ou la demi-vie) facilement compréhensible et très utile en modélisation par simulation et pour calculer les concentrations prévisibles dans l'environnement. Les méthodes empiriques ou les transformations linéaires peuvent produire une meilleure interpolation entre les courbes et les données et permettre ainsi une meilleure estimation des demi-vies, des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90} . L'utilisation des constantes dérivées est toutefois limitée. Les modèles à compartiments servent à établir des constantes utiles pour l'évaluation des risques qui décrivent la vitesse de dégradation dans les différents compartiments et la répartition de la substance chimique. Ils doivent également être utilisés pour estimer les constantes de vitesse de formation et de dégradation des principaux produits de transformation. Dans tous les cas, la méthode choisie doit être justifiée et l'expérimentateur doit démontrer graphiquement et/ou statistiquement la qualité de l'ajustement.

3. RAPPORT**3.1. RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport doit comprendre les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale (indiquant la position du marquage lorsqu'on utilise un produit radiomarqué) et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité molaire (s'il y a lieu).

▼B

Substances de référence:

- nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation.

Sédiments et eaux d'essai:

- localisation et description du (ou des) site(s) de prélèvement des sédiments aquatiques avec, si possible, l'historique de la contamination,
- toute information relative au prélèvement, au stockage (s'il y a lieu) et à l'acclimatation des systèmes eau-sédiment,
- caractéristiques des échantillons eau-sédiment telles qu'indiquées dans le tableau du point 1.8.2.2.

Conditions de l'essai:

- système d'essai utilisé (circulation continue, biomètre, mode de ventilation, méthode de remuage, volume d'eau, masse sédimentaire, épaisseur de la couche d'eau et de la couche de sédiment, dimension des récipients d'essai, etc.),
- application de la substance d'essai au système: concentration utilisée, nombre de répliqués et de témoins, mode d'application de la substance d'essai (usage éventuel de solvant), etc.,
- température d'incubation,
- temps de prélèvement,
- méthodes d'extraction, rendements et limites de détection des méthodes analytiques,
- méthodes de caractérisation/identification des produits de transformation,
- modification du protocole d'essai ou des conditions de l'essai pendant l'étude.

Résultats:

- données brutes des analyses représentatives (toutes les données brutes doivent être conservées dans les archives BPL),
- reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,
- taux de récupération (les % acceptables pour valider une étude sont présentés au point 1.7.1),
- tableaux des résultats exprimés en % de la dose appliquée et en mg.kg^{-1} dans l'eau, le sédiment et le système total (% uniquement) de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des produits de transformation et de la radioactivité non extractible,
- bilan massique pendant la durée et à la fin des expériences,
- représentation graphique de la transformation dans les fractions eau/sédiment et dans le système total (y compris la minéralisation),
- taux de minéralisation,

▼B

- durée de demi-vie, DT_{50} et, le cas échéant, valeurs DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation comprenant les limites de confiance dans l'eau, le sédiment et dans le système total,
- une évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, le cas échéant, des principaux produits de transformation,
- voie de transformation proposée, le cas échéant,
- discussion des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment System. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water Systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.
- (4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. p. 35-37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, p. 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988). Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, p. 149-158.

▼B

- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, p. 631-637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, p. 661-667.
- (18) Black, C.A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, p. 1038- 1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in fresh water mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, p. 2858-2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* p. 329-338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, p. 197-203.
- (27) ISO-14240-2. (1997). *Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method*.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen, (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), p. 13-21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, p. 850-857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550.
- (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, p. 1499-1509.

▼B

- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, p. 3597-3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contain. Toxicol.* 58, p. 961-968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer*, 39, p. 187-203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer*, 33, p. 47-60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases*, p. 1349- 1354.

▼B*Annexe I***INFORMATIONS SUR LES SYSTÈMES D'ESSAI AÉROBIES ET ANAÉROBIES****Système d'essai aérobie**

Le système d'essai aérobie décrit dans la présente méthode d'essai se compose d'une couche d'eau aérobie (généralement la concentration d'oxygène varie entre 7 et 10 mg.l⁻¹) et une couche de sédiment, aérobie à la surface et anaérobie sous la surface [généralement, le potentiel redox moyen (E_h) dans la zone anaérobie du sédiment est situé entre -80 et -190 mV]. On fait passer de l'air humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir suffisamment d'oxygène dans l'espace libre.

Système d'essai anaérobie

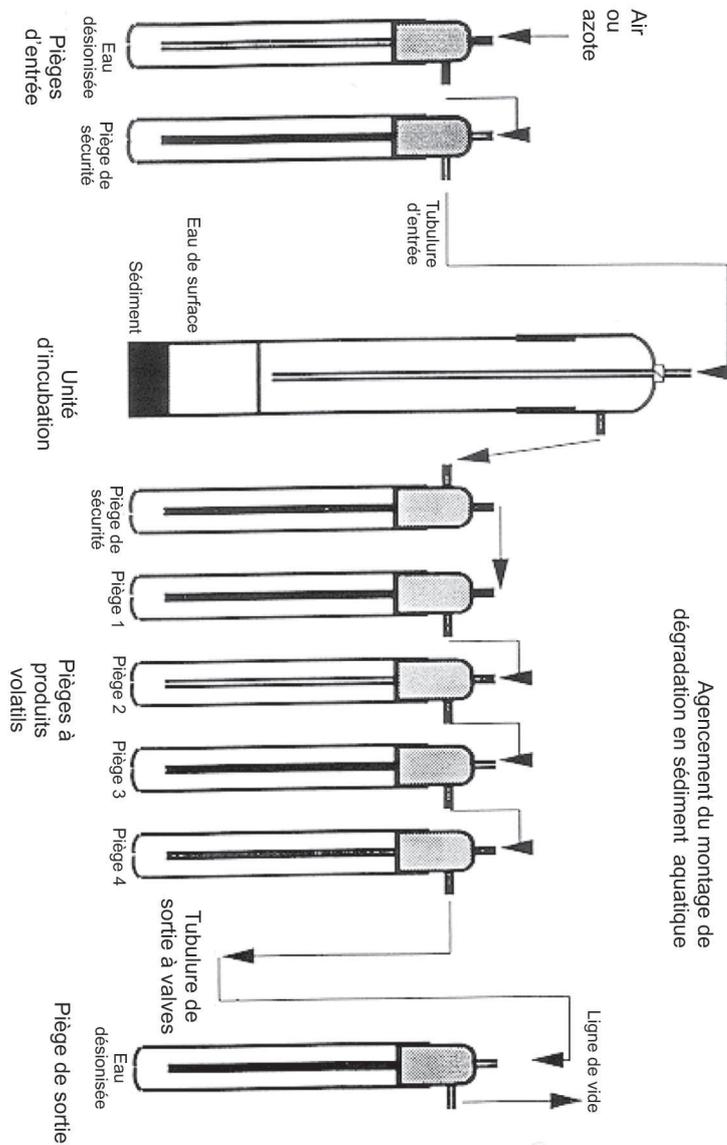
Dans le système d'essai anaérobie, la méthode d'essai est pratiquement la même que celle du système aérobie, à l'exception que l'on fait passer de l'azote humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir un espace libre d'azote. Le sédiment et l'eau sont considérés comme anaérobies lorsque le potentiel redox (E_h) est inférieur à -100 mV.

Dans l'essai anaérobie, l'évaluation de la minéralisation comprend la mesure du dioxyde de carbone et du méthane dégagé.

▼B

Annexe 2

EXEMPLE D'APPAREIL À CIRCULATION CONTINUE



Piège de sécurité, vide

Piège 1:

éthylène glycol pour piéger les produits volatils organiques

Piège 2:

acide sulfurique 0,1 M pour piéger les produits volatils alcalins

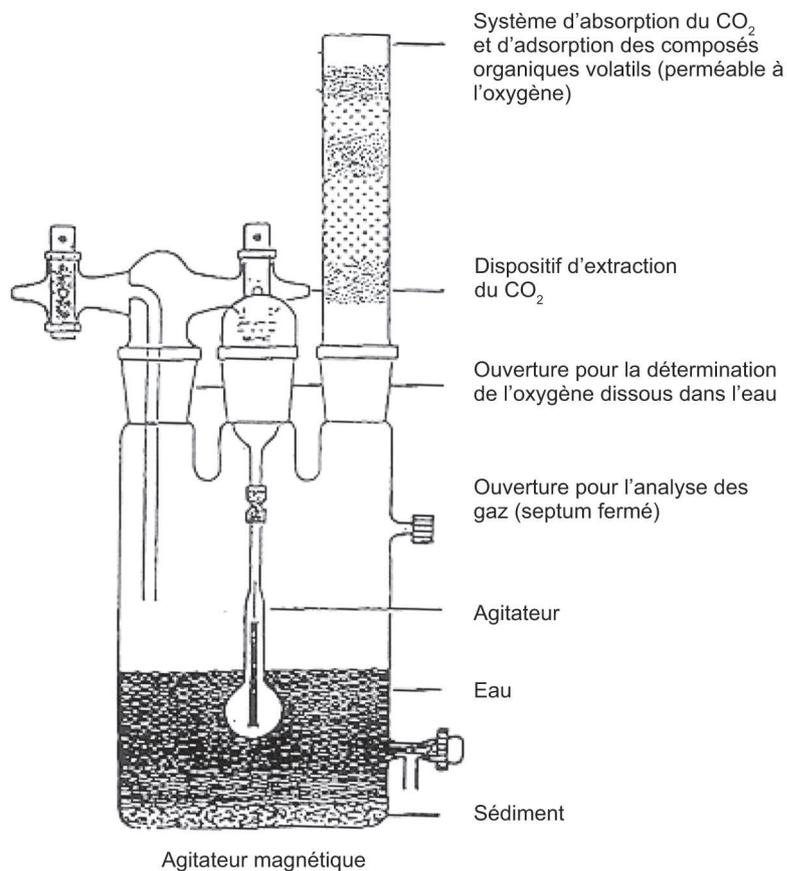
Pièges 3 & 4:

hydroxyde de sodium 2 M pour piéger le CO₂ et les autres produits volatils acides

▼B

Annexe 3

EXEMPLE DE BIOMÈTRE



▼B*Annexe 4***EXEMPLE DE CALCUL DE LA DOSE À APPLIQUER AUX RÉCIPIENTS D'ESSAI**

| | |
|--|--------------------------|
| Diamètre interne du cylindre: | = 8 cm |
| Profondeur de la colonne d'eau excluant le sédiment: | = 12 cm |
| Surface: $3,142 \times 4^2$ | = 50,3 cm ² |
| Taux d'application: 500 g de substance d'essai/ha correspondant à 5 µg/cm ² | |
| Total en µg: $5 \times 50,3$ | = 251,5 µg |
| Ajuster la quantité par rapport à la quantité correspondant à une profondeur de 100 cm: $12 \times 251,5 \div 100$ | = 30,18 µg |
| Volume de la colonne d'eau: $50,3 \times 12$ | = 603 ml |
| Concentration dans l'eau: $30,18 \div 603$ | = 0,050 µg/ml ou 50 µg/l |

▼ M1**C.25. MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES — ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION****1. MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 309 (2004) de l'OCDE (1).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai est destiné à mesurer la biodégradation en fonction du temps d'une substance d'essai présente en faible concentration dans une eau naturelle aérobie et à quantifier les observations sous la forme d'expressions cinétiques. Cet essai de simulation, réalisé en laboratoire avec des lots de flacons agités, sert à déterminer les vitesses de biodégradation aérobie de substances organiques dans des échantillons d'eaux naturelles de surface (douces, saumâtres ou marines). Il s'appuie sur la norme ISO/DIS 14592-1 (2) et reprend également des éléments des méthodes d'essai C.23 et C.24 (3)(4). Si l'essai dure longtemps, le procédé en lots peut être remplacé par un processus semi-continu, afin de prévenir la détérioration du microcosme expérimental. L'essai de simulation vise principalement à déterminer la minéralisation de la substance d'essai dans les eaux de surface, minéralisation qui est à la base de l'expression cinétique de la dégradation. Néanmoins, l'essai permet aussi, si on le souhaite, d'obtenir des renseignements sur la dégradation primaire et la formation des principaux produits de transformation. L'identification des produits de transformation et, si possible, la quantification de leurs concentrations, sont particulièrement importantes pour les substances qui se minéralisent très lentement (par exemple, dont la demi-vie du ^{14}C résiduel total dépasse soixante jours). L'identification et la quantification des principaux produits de transformation réclament normalement des concentrations plus élevées de la substance d'essai (par exemple, $> 100 \mu\text{g/l}$), en raison des limites analytiques.

Dans cet essai, on entend par faible concentration (par exemple, inférieure à $1 \mu\text{g/l}$ et jusqu'à $100 \mu\text{g/l}$), une concentration suffisamment faible pour que la cinétique de biodégradation obtenue au cours de l'essai reflète les cinétiques que l'on s'attend à trouver dans l'environnement. Comparée à la masse totale des substrats carbonés biodégradables présents dans l'eau naturelle utilisée pour l'essai, la substance d'essai en faible concentration servira de substrat secondaire. Cela implique que la cinétique de biodégradation attendue soit de premier ordre (cinétique de «non-croissance») et que la substance d'essai puisse être dégradée par «cométabolisme». Une cinétique de premier ordre signifie que la vitesse de dégradation (mg/l/jour) est proportionnelle à la concentration du substrat qui diminue au cours du temps. Avec une véritable cinétique de premier ordre, la constante spécifique de la vitesse de dégradation, k , est indépendante du temps et de la concentration. Autrement dit, k ne varie pas sensiblement au cours d'une expérience et ne se modifie pas avec l'augmentation de la concentration entre les expériences. Par définition, la constante spécifique de la vitesse de dégradation est égale au changement relatif de concentration par unité de temps: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Bien qu'il faille normalement s'attendre à une cinétique de premier ordre dans les conditions prescrites, il se peut que d'autres cinétiques soient plus appropriées dans certaines circonstances. Des écarts par rapport à la cinétique de premier ordre peuvent s'observer si, par exemple, un phénomène de transfert de masse, tel que la vitesse de diffusion, plutôt que la vitesse de réaction biologique, freine la biotransformation. Cependant, les résultats peuvent presque toujours être décrits par une cinétique de pseudo-premier ordre acceptant une constante de vitesse dépendante de la concentration.

▼ **M1**

Avant d'entamer l'essai, il faudrait disposer d'informations sur la biodégradabilité de la substance d'essai aux concentrations supérieures (tirées, par exemple, d'essais préliminaires standard) et de données sur la dégradabilité abiotique, les produits de transformation et les propriétés physico-chimiques pertinentes, afin de mieux planifier l'essai et de faciliter l'interprétation des résultats. L'utilisation de substances d'essai marquées au ^{14}C et la détermination de la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai permettent de déterminer la biodégradabilité finale. Si on utilise une substance d'essai non marquée, la biodégradation finale ne peut être estimée que si une concentration supérieure est mise à l'essai et si tous les principaux produits de transformation sont connus.

1.2. DÉFINITIONS

Biodégradation primaire: transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, débouchant sur la perte de l'identité chimique.

Biodégradation fonctionnelle: transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, entraînant la perte d'une propriété spécifique.

Biodégradation aérobie finale: décomposition d'une substance chimique par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents (minéralisation) et production d'une nouvelle biomasse et de produits organiques par synthèse biomicrobienne.

Minéralisation: décomposition d'une substance chimique ou de matières organiques par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents.

Phase de latence: période comprise entre le début de l'essai et le moment où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique atteint une valeur détectable (par exemple, 10 % de la biodégradation théorique maximale, ou moins, selon la précision de la technique de mesure) et durant laquelle les microorganismes dégradants s'adaptent.

Degré maximal de biodégradation: degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique, au cours d'un essai, enregistré en pourcentage, au delà duquel la biodégradation ne se produit plus durant l'essai.

Substrat primaire: ensemble de sources de carbone naturel et d'énergie grâce auxquelles la biomasse microbienne croît et se maintient.

Substrat secondaire: élément du substrat présent à une concentration si faible que sa dégradation ne fournit que des quantités négligeables de carbone et d'énergie aux microorganismes compétents, en comparaison avec l'apport de carbone et d'énergie que les microorganismes tirent de la dégradation des principaux composés du substrat (substrats primaires).

Constante de vitesse de dégradation: constante de vitesse correspondant à une cinétique de premier ordre ou de pseudo-premier ordre, k (jour^{-1}), indiquant la vitesse des processus de dégradation. Dans un essai en lots, k est estimé à partir de la première partie de la courbe de dégradation, débutant juste après la fin de la phase de latence.

▼ **M1**

Demi-vie, $t_{1/2}$ (jour): caractérise la vitesse d'une réaction de premier ordre; c'est le laps de temps durant lequel la concentration diminue d'un facteur 2. La relation entre la demi-vie et la constante de vitesse de dégradation est régie par l'équation: $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Demi-temps de dégradation, TD_{50} (jour): quantifie le résultat des essais de biodégradation; c'est le laps de temps, incluant la phase de latence, nécessaire pour atteindre 50 % de biodégradation.

Seuil de détection et seuil de quantification: le seuil de détection est la concentration d'une substance en dessous de laquelle il n'est plus possible de distinguer l'identité de la substance des artéfacts de la technique d'analyse. Le seuil de quantification est la concentration d'une substance en dessous de laquelle la concentration ne peut être déterminée avec une précision acceptable.

Carbone organique dissous (COD): fraction du carbone organique présent dans un échantillon d'eau qui ne peut être extraite par une technique de séparation des phases définie, par exemple par centrifugation à $40\,000\text{ ms}^{-2}$ durant 15 minutes ou par filtration sur une membrane dont les pores mesurent entre 0,20 et 0,45 μm de diamètre.

Activité totale du ^{14}C organique (AOT): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique.

Activité du ^{14}C organique dissous (AOD): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique dissous.

Activité du ^{14}C organique particulaire (AOP): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique particulaire.

1.3. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

Cet essai de simulation s'applique aux substances organiques non volatiles ou légèrement volatiles testées à de faibles concentrations. Si l'on utilise des flacons ouverts à l'atmosphère (par exemple, fermés par des tampons d'ouate), les substances dont les constantes de Henry sont inférieures à environ $1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (approximativement $10^{-5}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) peuvent être considérées comme non volatiles en pratique. En utilisant des flacons fermés pourvus d'un espace libre au-dessus du liquide, il est possible de mettre à l'essai des substances légèrement volatiles (avec des constantes de Henry $< 100\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ou $< 10^{-3}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) sans que le système expérimental ne fuie. Des pertes de substances marquées au ^{14}C peuvent se produire si les précautions requises ne sont pas prises, lors de l'extraction du CO_2 . Dans ces situations, il peut être nécessaire de piéger le CO_2 dans un absorbeur interne renfermant un produit alcalin ou d'utiliser un dispositif externe d'absorption du CO_2 (détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$; voir annexe 3). Pour la détermination de la cinétique de biodégradation, les concentrations de la substance d'essai doivent être inférieures à la solubilité de cette dernière dans l'eau. Remarquons, toutefois, que les valeurs d'hydrosolubilité mentionnées dans les publications peuvent dépasser de beaucoup la solubilité de la substance d'essai dans les eaux naturelles. Il est possible, le cas échéant, de déterminer la solubilité des substances d'essai particulièrement peu solubles dans l'eau en utilisant les eaux naturelles mises à l'essai.

La méthode permet de simuler la biodégradation dans des eaux superficielles exemptes de particules grossières («essai pélagique») ou dans des eaux superficielles troubles, comme celles qui peuvent se trouver à proximité d'une interface eau-sédiments («essai en suspension de sédiments»).

▼ M1

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

On réalise l'essai par lots, en incubant la substance d'essai dans l'eau superficielle uniquement («essai pélagique»), ou dans l'eau superficielle enrichie d'une suspension de solides/sédiments de 0,01 à 1 g/l de poids sec («essai en suspension de sédiments») pour simuler un plan d'eau contenant des solides en suspension ou des sédiments resuspendus. La plupart des eaux superficielles renferment des solides/sédiments en suspension à une concentration correspondant aux valeurs inférieures de cette gamme. Les flacons d'essai sont incubés dans l'obscurité à la température de l'environnement étudié, en aérobiose et sous agitation. Il faut utiliser au moins deux concentrations différentes de la substance d'essai pour déterminer la cinétique de dégradation. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur de 5 à 10 et représenter la gamme de concentrations supposée régner dans l'environnement. La concentration maximale de la substance d'essai ne devrait pas excéder 100 µg/l, mais il est préférable d'appliquer des concentrations maximales inférieures à 10 µg/l pour s'assurer que la biodégradation obéit à une cinétique de premier ordre. La concentration la plus faible ne devrait pas dépasser 10 µg/l, mais il vaut mieux choisir une concentration minimale de 1 à 2 µg/l ou inférieure à 1 µg/l. En règle générale, une concentration aussi faible peut être correctement analysée en utilisant des substances marquées au ¹⁴C vendues dans le commerce. Compte tenu des limites analytiques, il est souvent impossible de mesurer la concentration de la substance d'essai avec la précision requise si cette substance est appliquée à une concentration ≤ 100 µg/l (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.2). Des concentrations plus élevées de la substance d'essai (>100 µg/l et quelquefois > 1 mg/l) peuvent être utilisées pour l'identification et la quantification des principaux produits de transformation, ou s'il n'existe pas de méthode d'analyse spécifique pourvue d'un seuil de détection bas. En testant des concentrations élevées de la substance d'essai, on risque de ne pas pouvoir utiliser les résultats pour estimer la constante de dégradation de premier ordre et la demi-vie, car la dégradation n'obéira probablement pas à une cinétique de premier ordre.

La dégradation est suivie, à des intervalles de temps appropriés, par la mesure du ¹⁴C résiduel ou de la concentration résiduelle de la substance d'essai lorsqu'on utilise une méthode spécifique d'analyse chimique. Le marquage au ¹⁴C de la partie la plus stable de la molécule permet de déterminer la minéralisation totale, tandis que le marquage d'une partie moins stable de la molécule, de même que le recours à une analyse spécifique, ne permettra d'évaluer que la biodégradation primaire. Néanmoins, la partie la plus stable n'inclut pas nécessairement le groupement fonctionnel pertinent de la molécule (qui peut lui conférer une propriété particulière, telle que la toxicité, la bioaccumulation, etc.). Si c'est le cas, il peut être utile d'utiliser une substance d'essai, marquée au ¹⁴C, dans le groupement fonctionnel, afin de suivre l'élimination de la propriété particulière.

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Cet essai convient aussi bien aux substances radiomarquées qu'aux substances non marquées. Le marquage recommandé est celui au ¹⁴C et devrait normalement s'effectuer sur la ou les parties les plus stables de la molécule (voir également paragraphe 1.4). Pour les substances renfermant plus d'un cycle aromatique, il est préférable de marquer un ou plusieurs atomes de carbone de chaque cycle. En outre, il est préférable de marquer au ¹⁴C un ou plusieurs atomes de carbone situés de part et d'autre d'une liaison chimique facilement dégradable. La pureté chimique et/ou radiochimique de la substance d'essai devrait être supérieure à 95 %. En ce qui concerne les substances radiomarquées, une activité spécifique d'au moins quelque 50 µCi/mg (1,85 MBq) est préférable pour faciliter la mesure du ¹⁴C dans les essais réalisés avec de faibles concentrations initiales. Les informations suivantes sur la substance d'essai devraient être connues:

▼ M1

- solubilité dans l'eau [méthode A.6],
- solubilité dans un ou plusieurs solvants organiques (substances appliquées avec un solvant ou peu solubles dans l'eau),
- constante de dissociation (pKa) si la substance est sujette à la protonation ou à la déprotonation [ligne directrice TG 112 de l'OCDE] (5),
- pression de vapeur [méthode A.4] et constante de Henry,
- stabilité chimique dans l'eau et dans l'obscurité (hydrolyse) [méthode C.7].

Si des substances peu solubles dans l'eau sont mises à l'essai dans de l'eau de mer, il peut aussi être utile de connaître la constante de désalination (ou «constante de Setschenow») K_s , définie par l'expression suivante: $\log (S/S') = K_s \cdot C_m$, où S et S' représentent respectivement la solubilité de la substance dans l'eau douce et dans l'eau de mer, et C_m la concentration molaire des sels.

Si l'essai est un «essai en suspension de sédiments», on devrait également disposer des informations suivantes:

- coefficient de partage n-octanol/eau [méthode A.8],
- coefficient d'adsorption [méthode C.18],

Parmi les autres renseignements utiles, citons:

- la concentration dans la nature, si elle est connue ou estimée,
- la toxicité de la substance d'essai pour les microorganismes [méthode C.11],
- la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque [méthodes C.4 A-F, C.12, C.9, ligne directrice TG 302 de l'OCDE (5)],
- la biodégradabilité aérobie ou anaérobie dans le sol et les études de transformation sédiment/eau [méthodes C.23, C.24].

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il convient d'utiliser une substance de référence qui, normalement, se dégrade facilement en aérobie (aniline ou benzoate de sodium, par exemple). La dégradation de l'aniline et du benzoate de sodium prend généralement moins de deux semaines. L'emploi de substances de référence sert à vérifier que l'activité microbienne de l'eau d'essai se situe dans une certaine gamme, autrement dit, que l'eau renferme une flore microbienne active.

▼ **M1**

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

Immédiatement après l'ajout de la substance d'essai, chaque concentration expérimentale initiale devrait être vérifiée par une mesure de l'activité du ^{14}C , ou par des analyses chimiques s'il s'agit de substances non marquées, dans au moins deux échantillons. Cette mesure nous renseigne sur l'applicabilité et la répétabilité de la méthode d'analyse et sur l'homogénéité de la répartition de la substance d'essai. Normalement, on utilise l'activité du ^{14}C initiale mesurée, équivalant à la concentration de la substance d'essai, dans les analyses ultérieures des résultats plutôt que la concentration nominale, ce qui compense les pertes par sorption et les erreurs de dosage. Pour les substances d'essai marquées au ^{14}C , le taux de récupération à la fin de l'expérience est fourni par le bilan massique (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.4). Idéalement, le bilan massique radiomarqué devrait se situer entre 90 % et 110 %, tandis que la méthode d'analyse devrait donner un taux de récupération initial compris entre 70 % et 110 % pour les substances d'essai non marquées. Ces intervalles sont donnés à titre indicatif et ne devraient pas servir de critères d'acceptation pour l'essai. On peut, si on le souhaite, déterminer l'exactitude de la méthode d'analyse pour la substance d'essai à une concentration inférieure à la concentration initiale et pour les principaux produits de transformation.

1.7.2. **Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique**

La répétabilité de la méthode analytique (notamment l'efficacité de l'extraction initiale) pour quantifier la substance d'essai, et les produits de transformation le cas échéant, devrait être vérifiée par cinq analyses identiques d'extraits de l'eau superficielle.

Le seuil de détection de la méthode analytique pour la substance d'essai et les produits de transformation devrait, si possible, atteindre au moins 1 % de la quantité introduite initialement dans le système expérimental. La limite de quantification devrait être inférieure ou égale à 10 % de la concentration appliquée. Les analyses chimiques de nombreuses substances organiques et de leurs produits de transformation exigent souvent des concentrations relativement élevées de la substance d'essai, à savoir $> 100 \mu\text{g/l}$.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.8.1. **Matériel**

L'essai peut être effectué dans des flacons cylindriques ou coniques d'une capacité adéquate (0,5 ou 1,0 litre, par exemple), fermés par des bouchons en silicone ou en caoutchouc, ou dans des bouteilles à sérum munies de couvercles étanches au CO_2 (avec des bouchons cloisonnés (septas) en caoutchouc butylique, par exemple). Une autre possibilité consiste à pratiquer l'essai avec plusieurs flacons et à prélever des flacons entiers (au moins deux identiques) à chaque intervalle de prélèvement (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Pour les substances d'essai non volatiles et non radiomarquées, il n'est pas nécessaire d'employer des bouchons ou des couvercles étanches aux gaz; des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Les substances légèrement volatiles devraient être testées dans un système de type biomètre fournissant une agitation douce à la surface de l'eau. Si l'on veut être sûr d'empêcher toute contamination bactérienne, on peut éventuellement stériliser les récipients en les chauffant ou en les autoclavant avant l'emploi. En outre, les instruments courants de laboratoire suivants sont nécessaires:

— une table tournante ou des agitateurs magnétiques pour agiter en continu les flacons expérimentaux,

▼ M1

- une centrifugeuse,
- un pH-mètre,
- un turbidimètre pour les mesures néphélométriques de la turbidité,
- un four ou un four à micro-ondes pour les déterminations pondérales,
- un appareil de filtration à membrane,
- un autoclave ou un four pour stériliser la verrerie,
- des instruments permettant de manipuler les substances marquées au ^{14}C ,
- un appareil permettant de quantifier l'activité du ^{14}C dans des échantillons de solutions piégeant le CO_2 et, si nécessaire, dans des échantillons de sédiment,
- des instruments analytiques pour doser la substance d'essai (et de référence) si l'on pratique une analyse chimique spécifique (chromatographie en phase gazeuse, en phase liquide à haute pression, par exemple).

1.8.2. Solutions mères de la substance d'essai

Les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence sont préparées avec de l'eau désionisée (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.7). L'eau désionisée devrait être exempte de substances susceptibles d'être toxiques pour les microorganismes et la teneur en carbone organique dissous (COD) ne devrait pas dépasser 1 mg/l (6).

1.8.3. Prélèvement et transport de l'eau de surface

Quelle que soit la situation, le site de prélèvement de l'eau superficielle sera choisi en fonction de la finalité de l'essai. Il faut se renseigner sur le déversement antérieur d'éventuels effluents agricoles, industriels ou domestiques et en tenir compte dans la sélection du site. S'il s'avère qu'un milieu aquatique a été contaminé par la substance d'essai ou l'un de ses analogues de structure au cours des quatre dernières années, l'eau d'essai ne doit pas y être prélevée, à moins que l'expérimentateur n'étudie précisément la vitesse de dégradation dans des sites précédemment exposés. Le pH et la température de l'eau sont à mesurer sur le lieu de prélèvement. On notera également la profondeur de prélèvement et l'aspect de l'échantillon d'eau (couleur et turbidité, par exemple) (voir paragraphe 3). Il faut mesurer la concentration d'oxygène et/ou le potentiel redox dans l'eau et dans la couche superficielle du sédiment afin de démontrer l'aérobiose, sauf si cette condition est patente à en juger par l'apparence et une connaissance préalable du site. L'eau superficielle doit être transportée dans un récipient très bien nettoyé. Durant le transport, la température de l'échantillon n'excédera guère la température appliquée dans l'essai. Le refroidissement à 4 °C est recommandé si le transport dure plus de deux ou trois heures. Il ne faut pas congeler l'échantillon d'eau.

▼ M1**1.8.4. Stockage et préparation de l'eau superficielle**

Il est préférable de commencer l'essai au plus tard le lendemain du prélèvement de l'échantillon. Le cas échéant, le stockage de l'eau sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas quatre semaines. L'échantillon d'eau devrait être conservé à 4 °C, sous aération, jusqu'à utilisation. Les particules grossières devront être éliminées de l'échantillon d'eau avant son utilisation, par exemple par filtration à travers une toile de nylon dont les mailles mesurent quelque 100 µm ou un papier filtre grossier, ou par sédimentation.

1.8.5. Préparation de l'eau additionnée de sédiment (facultatif)

Pour l'essai en suspension de sédiment, on ajoute le sédiment superficiel aux flacons contenant l'eau naturelle (filtrée pour être exempte de particules grossières, comme décrit au paragraphe 1.8.4), afin d'obtenir une suspension; la concentration des solides suspendus devrait être comprise entre 0,01 et 1 g/l. Le sédiment superficiel devrait provenir du même site que l'échantillon d'eau. Suivant les particularités du milieu aquatique, le sédiment superficiel peut se caractériser soit par une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, soit par une faible teneur en carbone organique (0,5-2,5 %) et une texture grossière (3). Le sédiment superficiel peut être préparé de la façon suivante: extraire plusieurs carottes de sédiment au moyen de tubes en plastique transparent, découper les tranches contenant les couches supérieures aérobies (à une profondeur maximale de 5 mm à partir de la surface) immédiatement après le prélèvement, et les réunir. L'échantillon de sédiment ainsi obtenu devrait être transporté dans un récipient muni d'un vaste espace libre au-dessus du contenu, de façon à maintenir le sédiment en aérobiose (refroidir à 4 °C si le transport dure plus de deux à trois heures). L'échantillon de sédiment devrait être suspendu dans l'eau d'essai dans une proportion de 1/10 et conservé à 4 °C sous aération jusqu'à son utilisation. Le cas échéant, le stockage du sédiment sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas quatre semaines.

1.8.6. Procédé semi-continu (facultatif)

Une incubation prolongée (plusieurs mois) peut s'avérer nécessaire lorsqu'il s'écoule une longue période de latence avant qu'il ne soit possible de mesurer une dégradation sensible de la substance d'essai. Si des expérimentations antérieures ont révélé que tel était le cas de la substance d'essai, l'essai peut débiter par un procédé semi-continu qui permet le renouvellement périodique d'une partie de l'eau ou de la suspension d'essai (voir annexe 2). Par ailleurs, l'essai normal par lots peut être converti en essai semi-continu si aucune dégradation de la substance d'essai n'est observée après une soixantaine de jours d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.8.3).

1.8.7. Ajout de la substance d'essai (ou de référence)

Pour les substances dont l'hydrosolubilité est élevée (> 1 mg/l) et la volatilité faible (constante de Henry < 1 Pa.m³/mol ou < 10⁻⁵ atm.m³/mol), la solution mère peut être préparée dans de l'eau désionisée (voir paragraphe 1.8.2): on verse le volume nécessaire de solution mère dans les récipients expérimentaux pour obtenir la concentration voulue. Le volume de solution mère ajouté ne devrait pas excéder le minimum pratique (< 10 % du volume de liquide final, si possible). Un autre procédé consiste à dissoudre la substance d'essai dans un plus grand volume d'eau d'essai, au lieu de recourir à des solvants organiques, par exemple.

▼ M1

S'il est impossible de procéder autrement, les solutions mères de substances non volatiles et peu solubles dans l'eau sont préparées à l'aide d'un solvant organique volatil, mais la quantité de solvant ajoutée au système expérimental ne doit pas dépasser 1 % v/v, ni nuire à l'activité microbienne. Le solvant ne devrait pas affecter la stabilité de la substance d'essai dans l'eau. On enlève le solvant jusqu'à ce qu'il n'en subsiste qu'une quantité extrêmement faible, de façon à ce qu'il n'augmente pas sensiblement la teneur en COD de l'eau ou de la suspension d'essai. Ce point est à vérifier par une analyse de la substance d'essai ou, si possible, du COD (6). On veillera à limiter la quantité de solvant transférée au strict minimum pour dissoudre la quantité de substance d'essai dans le volume final d'eau d'essai. D'autres techniques permettant d'introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux peuvent être utilisées, comme cela a été décrit dans les références (7) et (8). Lorsqu'on utilise un solvant organique pour appliquer la substance d'essai, les témoins au solvant contenant l'eau d'essai (sans aucun ajout) et l'eau d'essai additionnée de la substance de référence devraient être traités de la même manière que les récipients expérimentaux renfermant la substance d'essai véhiculée par le solvant. Les témoins au solvant servent à mettre en évidence d'éventuels effets nocifs de ce dernier pour la flore microbienne, d'après la dégradation de la substance de référence.

1.8.8. Conditions expérimentales**1.8.8.1. Température**

L'incubation devrait avoir lieu dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse, à une température réglée (± 2 °C) qui peut être la température relevée sur le site ou une température standard de 20-25 °C. La température du site peut être la température de l'échantillon au moment du prélèvement ou une température moyenne du site de prélèvement.

1.8.8.2. Agitation

Il convient de fournir une agitation continue, afin de maintenir les particules et les microorganismes en suspension. L'agitation facilite également le transfert d'oxygène de l'espace libre situé au-dessus du liquide vers le liquide, ce qui permet de maintenir correctement l'aérobiose. Les flacons sont placés sur une table tournante (agitation d'environ 100 rpm) ou munis d'agitateurs magnétiques. L'agitation doit être continue, mais aussi douce que possible, de façon à maintenir l'homogénéité de la suspension.

1.8.8.3. Durée de l'essai

La durée de l'essai ne devrait normalement pas dépasser 60 jours, à moins que l'on n'ait opté pour le procédé semi-continu avec renouvellement périodique de la suspension expérimentale (voir paragraphe 1.8.6 et annexe 2). Toutefois, l'essai par lots peut-être prolongé jusqu'à 90 jours au maximum si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours. La dégradation est contrôlée, à intervalles appropriés, par la détermination de l'activité du ^{14}C résiduel ou du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé (voir paragraphe 1.8.9.4) et/ou par analyse chimique (paragraphe 1.8.9.5). Le temps d'incubation doit être suffisamment long pour permettre d'évaluer le processus de dégradation. Il serait préférable que la dégradation excède 50 %; pour les substances lentement dégradables, le degré de dégradation doit être suffisant (normalement supérieur à 20 %) pour permettre l'estimation d'une constante cinétique de la vitesse de dégradation.

▼ **M1**

Le pH et la concentration d'oxygène sont à mesurer périodiquement dans le système expérimental, à moins que l'expérience acquise par des essais identiques menés sur des échantillons d'eau et de sédiments prélevés sur le même site ne rende ces mesures superflues. Dans certaines conditions, le métabolisme de substrats primaires présents à des concentrations bien plus élevées dans l'eau ou le sédiment pourrait engendrer un dégagement de CO₂ et une diminution d'oxygène tels qu'ils modifieraient sensiblement les conditions expérimentales durant l'essai.

1.8.9. **Mode opératoire**1.8.9.1. *Préparation des flacons destinés à l'essai pélagique*

On transfère un volume approprié d'au moins quelque 100 ml d'eau d'essai dans les flacons expérimentaux, de façon à les remplir environ au tiers. Si on utilise plusieurs flacons (de façon à prélever des flacons entiers à chaque moment de prélèvement), le volume approprié d'eau d'essai s'élève aussi à environ 100 ml, les petits volumes risquant d'influencer la longueur de la phase de latence. La substance d'essai est ajoutée à partir d'une solution mère, comme décrit aux paragraphes 1.8.2 et 1.8.7. Il faudrait utiliser au moins deux concentrations de la substance d'essai, espacées d'un facteur de 5 à 10, pour déterminer la cinétique de dégradation et calculer la constante cinétique de la vitesse de dégradation. Les deux concentrations choisies devraient être inférieures à 100 µg/l et de préférence comprises dans l'intervalle 1-10 µg/l.

Les flacons sont fermés avec des bouchons ou des couvercles étanches à l'air et au CO₂. Pour les substances d'essai non volatiles et non marquées au ¹⁴C, des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir paragraphe 1.8.1), à condition que les principaux produits de dégradation soient notoirement non volatils et que l'on procède à une détermination indirecte du CO₂ (voir annexe 3).

Les flacons sont incubés à la température choisie (voir paragraphe 1.8.8.1). Les échantillons destinés à l'analyse chimique ou à la détermination du ¹⁴C sont prélevés au début de l'essai (avant le début de la biodégradation; voir paragraphe 1.7.1), puis à une fréquence appropriée au cours de l'essai. Le prélèvement peut s'effectuer par l'extraction de sous-échantillons (aliquotes de 5 ml, par exemple) de chaque expérience identique ou par la collecte de flacons entiers à chaque moment de prélèvement. La minéralisation de la substance d'essai se détermine directement ou indirectement (voir annexe 3). Habituellement, il est nécessaire d'inclure au moins cinq points de prélèvement durant la phase de dégradation (après la fin de la phase de latence) pour estimer une constante de vitesse fiable, sauf si l'on peut justifier que trois points de prélèvement suffisent pour les substances rapidement dégradables. Les substances à dégradation lente se prêtent aisément à plus de mesures durant la phase de dégradation, si bien qu'il faut inclure plus de points pour l'estimation de k. Il est impossible de prescrire un calendrier fixe pour les prélèvements puisque la vitesse de biodégradation varie; on recommande toutefois d'effectuer un prélèvement par semaine si la dégradation est lente. Si la substance d'essai se dégrade rapidement, les prélèvements devraient avoir lieu une fois par jour durant les trois premiers jours, puis tous les deux ou trois jours. Dans certaines circonstances, notamment dans le cas de substances s'hydrolysant très rapidement, il pourra être nécessaire de pratiquer un prélèvement horaire. On recommande d'effectuer une étude préliminaire avant l'essai, afin de déterminer le rythme de prélèvement approprié. Si l'on doit conserver des échantillons en vue d'autres analyses spécifiques, il est préférable de prélever davantage d'échantillons et de sélectionner ensuite ceux à analyser à la fin de l'expérience suivant une logique d'ordre inverse, c'est-à-dire que les derniers échantillons seront analysés en premier (le deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.5 donne des conseils sur la façon de préserver la stabilité des échantillons durant le stockage).

▼ M11.8.9.2. *Nombre de flacons et d'échantillons*

Préparer suffisamment de flacons expérimentaux de façon à disposer:

- de flacons d'essai: au moins deux flacons pour chaque concentration de la substance d'essai (de préférence au moins trois) ou une série de flacons d'essai pour chaque concentration si des flacons entiers sont prélevés à chaque moment de prélèvement (symbolisés par F_T),
- de flacons d'essai pour le calcul du bilan massique: au moins deux flacons pour chaque concentration expérimentale (symbolisés par F_M),
- de témoins sans substance d'essai: au moins un flacon ne contenant que l'eau d'essai (symbolisé par F_B),
- de témoins de référence: deux flacons contenant la substance de référence (aniline ou benzoate de sodium, par exemple, à 10 µg/l) (symbolisés par F_C). Le témoin de référence sert à confirmer l'existence d'une activité microbienne minimale. S'il y a lieu, une substance de référence radiomarquée peut être utilisée, y compris lorsque la dégradation de la substance d'essai est suivie par des analyses chimiques,
- de témoins stériles: un ou deux flacons contenant de l'eau d'essai stérilisée pour vérifier l'existence éventuelle d'une dégradation abiotique ou d'une autre élimination non biologique de la substance d'essai (symbolisés par F_S). L'activité biologique peut être supprimée par autoclavage (121 °C; 20 min) de l'eau d'essai ou par ajout d'un toxique [par exemple, azoture de sodium (NaN_3) à 10-20 g/l, chlorure de mercure (HgCl_2) à 100 mg/l ou formaldéhyde à 100 mg/l] ou par irradiation gamma. Si l'on utilise du HgCl_2 , il faudra l'éliminer comme un déchet toxique. Il est difficile de stériliser une eau renfermant une grande quantité de sédiments ajoutés; dans ce cas, un autoclavage répété est recommandé (par exemple, trois fois). Il faut tenir compte du fait que les caractéristiques de sorption du sédiment peuvent être altérées par l'autoclavage,
- de témoins au solvant contenant l'eau d'essai ainsi que l'eau d'essai et la substance de référence: des flacons en double exemplaire contenant la même quantité de solvant, appliquée de la même façon que la substance d'essai. Ces témoins servent à détecter une éventuelle nocivité du solvant, d'après la dégradation de la substance de référence.

En concevant l'essai, l'expérimentateur doit apprécier l'importance relative de l'augmentation du nombre d'expériences identiques au regard de l'augmentation de la fréquence des prélèvements. Le nombre exact de flacons requis dépendra de la méthode employée pour mesurer la dégradation (voir troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.1 et du paragraphe 1.8.9.4, ainsi que l'annexe 3).

▼ M1

On prélève deux sous-échantillons (par exemple, des aliquotes de 5 ml) dans chaque flacon expérimental, à chaque moment de prélèvement. Si on utilise une série de flacons afin de prélever des flacons entiers, il faut sacrifier au moins deux flacons à chaque moment de prélèvement (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Préparation des flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments (facultatif)*

On verse les volumes nécessaires d'eau d'essai et de sédiments, le cas échéant, dans les flacons expérimentaux (voir paragraphe 1.8.5). Les flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments sont préparés de la même façon que les flacons pour l'essai pélagique (voir paragraphes 1.8.9.1 et 1.8.9.2). On utilise de préférence des bouteilles à sérum ou des flacons ayant la même forme. Les flacons fermés sont placés horizontalement sur un agitateur. Il va de soi que les flacons ouverts contenant les substances non volatiles, non marquées au ^{14}C , doivent être placés en position verticale; dans ce cas, il est recommandé d'utiliser des agitateurs magnétiques et des barres magnétiques enrobées de verre. Si nécessaire, on aère les bouteilles pour maintenir une aérobose adéquate.

1.8.9.4. *Déterminations radiochimiques*

Le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé se mesure directement et indirectement (voir annexe 3). Le $^{14}\text{CO}_2$ est mesuré indirectement d'après la différence entre l'activité initiale du ^{14}C dans l'eau d'essai ou la suspension et l'activité résiduelle totale au moment du prélèvement, mesurée après avoir acidifié l'échantillon à pH 2-3 et extrait le CO_2 . Le carbone minéral est ainsi éliminé et l'activité résiduelle mesurée provient des composés organiques. Le $^{14}\text{CO}_2$ ne doit pas être déterminé indirectement s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation qui se forment (voir annexe 3). Si possible, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ est mesuré directement (voir annexe 3) à chaque moment de prélèvement dans au moins un flacon expérimental; ce mode opératoire permet de vérifier le bilan massique et le processus de biodégradation, mais il ne convient qu'aux essais réalisés avec des flacons fermés.

Si le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé est mesuré directement au cours de l'essai, il convient de prévoir un plus grand nombre de flacons à cet effet au début de l'essai. La détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$ est recommandée s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation de la substance d'essai. À chaque point de mesure, les flacons expérimentaux supplémentaires sont acidifiés à pH 2-3 et le $^{14}\text{CO}_2$ est collecté dans un absorbeur interne ou externe (voir annexe 3).

On peut, si on le souhaite, déterminer les concentrations de la substance d'essai marquée au ^{14}C et des principaux produits de transformation par radiochromatographie (par exemple, chromatographie en couche mince, RAD-TLC) ou HPLC couplée à une détection radiochimique.

On peut aussi, si on le souhaite, déterminer la répartition entre les phases de la radioactivité restante (voir annexe 1), ainsi que de la substance d'essai résiduelle et des produits de transformation.

▼ M1

À la fin de l'essai, le bilan massique devrait être établi par une mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$, effectuée à l'aide de flacons expérimentaux distincts d'où aucun échantillon n'a été prélevé au cours de l'essai (voir annexe 3).

1.8.9.5. Analyse chimique spécifique

Si l'on dispose d'une méthode analytique spécifique sensible, la biodégradation primaire peut être évaluée par une mesure de la concentration résiduelle totale de la substance d'essai, plutôt que par des techniques de radiomarquage. Si l'on utilise une substance d'essai radiomarquée (pour mesurer la minéralisation totale), des analyses chimiques spécifiques peuvent être pratiquées en parallèle pour fournir des informations supplémentaires utiles et vérifier le procédé. Des analyses chimiques spécifiques peuvent aussi être utilisées pour mesurer les produits de transformation formés durant la dégradation de la substance d'essai, et cette procédure est recommandée pour les substances dont la demi-vie de minéralisation dépasse soixante jours. La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque moment de prélèvement devrait être mesurée et rapportée (en termes de concentration et de pourcentage appliqué). En général, les produits de transformation détectés à $\geq 10\%$ de la concentration appliquée, à un quelconque moment de prélèvement, doivent être identifiés, à moins que le contraire ne se justifie. On envisagera aussi d'identifier les produits de transformation dont les concentrations s'accroissent continuellement au cours de l'étude, même si leur concentration n'atteint pas le seuil susmentionné, car cela pourrait être un signe de persistance. On envisagera d'analyser les produits de transformation présents dans les témoins stériles si une transformation abiotique rapide de la substance d'essai (par hydrolyse, par exemple) est jugée possible. La nécessité de quantifier et d'identifier les produits de transformation est à évaluer cas par cas et à justifier dans le rapport. Les techniques d'extraction faisant appel à un solvant organique doivent être appliquées selon les instructions données pour le procédé d'analyse respectif.

Tous les échantillons doivent être stockés à une température de 2 à 4 °C dans des récipients étanches à l'air si l'analyse est réalisée dans les vingt-quatre heures, ce qui est préférable. Si la période de stockage est plus longue, les échantillons doivent être congelés à -18 °C ou conservés chimiquement. Il est déconseillé d'acidifier les échantillons pour les conserver, car l'acidification risque de les rendre instables. Si les échantillons ne sont pas analysés dans les vingt-quatre heures et sont conservés au-delà de ce délai, une étude de stabilité du stockage doit être effectuée pour démontrer la stabilité des produits chimiques en question à -18 °C ou dans des conditions de conservation. Si la méthode d'analyse requiert une extraction au solvant ou une extraction de la phase solide, l'extraction doit être menée immédiatement après le prélèvement ou après le stockage de l'échantillon au réfrigérateur durant vingt-quatre heures au maximum.

Suivant la sensibilité de la méthode analytique, il pourra être nécessaire de prélever des échantillons d'un volume supérieur à celui indiqué au paragraphe 1.8.1. Il est facile de réaliser l'essai avec des volumes d'un litre contenus dans des flacons d'une capacité de 2 à 3 litres, ce qui permet de recueillir des échantillons d'environ 100 ml.

▼ **M1****2. RÉSULTATS ET RAPPORT****2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS****2.1.1. Représentation graphique des résultats**

Il convient d'arrondir les intervalles de prélèvement à un nombre d'heures entier (sauf si la substance se dégrade fortement en l'espace de quelques heures ou minutes), mais pas à un nombre de jours entier. On produit un tracé linéaire et un tracé semi-logarithmique des estimations de l'activité résiduelle de la substance d'essai (pour les substances marquées au ^{14}C) ou de la concentration résiduelle (pour les substances non marquées) en fonction du temps (voir figures 1a et 1b). S'il y a eu une dégradation, on compare les résultats des flacons F_T à ceux des flacons F_S . Si les moyennes des résultats des flacons contenant la substance d'essai (F_T) et des flacons stériles (F_S) s'écartent de moins de 10 %, on peut supposer que la dégradation observée est principalement abiotique. Si la dégradation mesurée dans les flacons F_S est inférieure, les résultats peuvent être utilisés pour corriger ceux obtenus dans les flacons F_T (par soustraction), en vue d'estimer l'ampleur de la biodégradation. Si des analyses facultatives sont effectuées sur les principaux produits de transformation, il faut fournir un tracé de leur formation et disparition en fonction du temps, en plus d'un tracé de la disparition de la substance d'essai.

On estime la durée de la phase de latence t_L à partir de la courbe de dégradation (tracé semi-logarithmique), en extrapolant sa partie linéaire jusqu'à une dégradation nulle ou en déterminant la durée d'une dégradation d'environ 10 % (voir figures 1a et 1b). À partir du tracé semi-logarithmique, on estime la constante de vitesse de premier ordre, k , et son écart-type par régression linéaire du \ln (activité résiduelle du ^{14}C ou concentration de la substance d'essai) en fonction du temps. Avec les mesures du ^{14}C en particulier, on n'utilisera que les résultats se rapportant à la partie linéaire initiale de la courbe, située après la phase de latence, et l'on s'attachera à sélectionner un petit nombre de résultats représentatifs, plutôt qu'un grand nombre de résultats incertains. Ici, l'incertitude comprend les erreurs inhérentes à l'utilisation directe recommandée des activités résiduelles du ^{14}C mesurées (voir plus bas). Il peut parfois s'avérer pertinent de calculer deux constantes de vitesse différentes, si la dégradation suit un mode biphasique. À cet effet, on délimite deux phases différentes de la courbe de dégradation. Il convient de calculer la constante de vitesse, k , et la demi-vie, $t_{1/2} = \ln 2/k$, pour chacun des flacons des expériences identiques, lorsque des sous-échantillons sont prélevés à partir du même flacon, ou en utilisant les valeurs moyennes, lorsqu'on recueille des flacons entiers à chaque moment de prélèvement (voir paragraphe 1.8.9.2). Si l'on applique le premier procédé mentionné, la constante de vitesse et la demi-vie doivent être rapportées individuellement pour chacun des flacons en double et exprimées sous la forme d'une moyenne avec un écart-type. Si les concentrations de la substance d'essai sont élevées, la courbe de dégradation pourrait s'écarter considérablement d'une droite (tracé semi-logarithmique) et la cinétique de premier ordre risque de ne pas être valable. Dans ces circonstances, la détermination d'une demi-vie n'aurait pas de sens. Cependant, il est possible d'appliquer une cinétique de pseudo-premier ordre à une gamme limitée de résultats et d'estimer la demi-vie de dégradation TD_{50} (temps nécessaire pour atteindre 50 % de dégradation). On gardera toutefois à l'esprit qu'il est impossible de prédire la durée de la dégradation au-delà de la gamme limitée de résultats en utilisant la TD_{50} , qui n'est qu'un descripteur d'un ensemble donné de résultats. Les outils analytiques facilitant les calculs statistiques et l'ajustement des courbes sont faciles à se procurer et l'usage de ce type de logiciel est recommandé.

▼ **M1**

Si des analyses chimiques spécifiques sont pratiquées, on estime les constantes de vitesse et les demi-vies pour la dégradation primaire comme indiqué plus haut pour la minéralisation totale. Si la dégradation primaire est le processus limitant, les résultats ponctuels se rapportant à la totalité du processus de dégradation peuvent quelquefois être utilisés. Et ce, parce qu'il s'agit de mesures directes, contrairement aux mesures de l'activité du ^{14}C .

Si l'on utilise des substances marquées au ^{14}C , le bilan massique devrait être exprimé en pourcentage de la concentration initiale appliquée, au moins à la fin de l'essai.

2.1.2. **Activité résiduelle**

Lorsque le fragment marqué au ^{14}C d'une substance organique est biodégradé, la majeure partie du ^{14}C est convertie en $^{14}\text{CO}_2$, tandis qu'une autre partie est mobilisée par la croissance de la biomasse et/ou la synthèse de métabolites extra-cellulaires. Aussi, la biodégradation complète, «finale», d'une substance ne correspond-elle pas à une conversion à 100 % de son carbone en $^{14}\text{CO}_2$. Le ^{14}C intégré aux produits biosynthétisés est ensuite libéré lentement sous la forme de $^{14}\text{CO}_2$ à la suite d'une «minéralisation secondaire». C'est pourquoi les tracés de l'activité du ^{14}C organique résiduel (mesurée après l'extraction du CO_2) ou du $^{14}\text{CO}_2$ produit en fonction du temps se prolongent au-delà de la fin de la dégradation. Cela complique l'interprétation cinétique des résultats, de sorte que seule la première partie de la courbe (juste après la fin de la phase de latence et avant que la dégradation atteigne environ 50 %) devrait normalement être utilisée pour l'estimation de la constante de vitesse de dégradation. Si la substance d'essai est dégradée, l'activité du ^{14}C résiduel organique total est toujours supérieure à l'activité du ^{14}C associée à la substance d'essai intacte restante. Si la substance d'essai est dégradée par une réaction de premier ordre et qu'une fraction constante α est minéralisée en CO_2 , la pente initiale de la courbe de disparition du ^{14}C (^{14}C organique total en fonction du temps) sera égale à α fois la pente de la courbe correspondante de concentration de la substance d'essai (ou, plus précisément, du fragment de la substance d'essai marqué au ^{14}C). Les mesures de l'activité du ^{14}C organique total utilisées n'étant pas corrigées, la constante de vitesse de dégradation sera calculée avec une marge de sécurité. Des procédés permettant d'estimer les concentrations de la substance d'essai à partir des activités radiochimiques mesurées, sur la base de diverses hypothèses simplificatrices, ont été décrits dans des publications (2)(9)(10)(11). Ces procédés s'appliquent le plus facilement aux substances rapidement dégradables.

2.2. **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

S'il s'avère que k est indépendant de la concentration (si le k calculé est à peu près identique aux différentes concentrations de la substance d'essai), on peut supposer que la constante de vitesse de premier ordre est représentative des conditions expérimentales appliquées, à savoir la substance d'essai, l'échantillon d'eau et la température de l'essai. Il appartient à un expert d'apprécier dans quelle mesure les résultats peuvent être généralisés ou extrapolés à d'autres systèmes. Si la substance d'essai est testée à une concentration élevée et que, de ce fait, la dégradation n'obéit pas à une cinétique de premier ordre, les résultats ne peuvent servir à estimer directement une constante de vitesse de premier ordre ou la demi-vie correspondante. Cependant, les données fournies par un essai mené à une concentration élevée de la substance d'essai peuvent toujours être utilisées pour estimer le degré de minéralisation totale et/ou détecter et quantifier les produits de transformation.

▼ **M1**

Si les vitesses de phénomènes de disparition autres que la biodégradation sont connues (hydrolyse ou volatilisation, par exemple), elles peuvent être soustraites de la vitesse de disparition nette relevée durant l'essai, pour fournir une estimation approximative de la vitesse de biodégradation. Les valeurs concernant l'hydrolyse peuvent, par exemple, être obtenues à partir du témoin stérile ou d'un essai parallèle mené à une concentration plus élevée de la substance d'essai.

Les déterminations indirecte et directe du $^{14}\text{CO}_2$ (paragraphe 1.8.9.4 et annexe 3) ne peuvent être utilisées que pour mesurer l'ampleur de la minéralisation de la substance d'essai en CO_2 . La radiochromatographie en couche mince (RAD-TLC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) peuvent servir à analyser la concentration de la substance d'essai marquée au ^{14}C et la formation des principaux produits de transformation (troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.4). La demi-vie ne peut être estimée directement qu'en l'absence de tous les principaux produits de transformation (définis comme étant $\geq 10\%$ de la quantité de substance d'essai appliquée). En présence de produits de transformation principaux (selon la définition ci-dessus), une évaluation détaillée des résultats est requise. Cette évaluation peut inclure l'essai et/ou l'identification répétés des produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), à moins que le devenir des produits de transformation ne puisse être raisonnablement évalué d'après l'expérience antérieure (par exemple, des informations sur les voies de dégradation). La proportion de carbone de la substance d'essai convertie en CO_2 variant (en grande partie en fonction de la concentration de la substance d'essai et des autres substrats disponibles, des conditions expérimentales et de la flore microbienne), cet essai ne permet pas d'estimer directement la biodégradation finale, comme dans un essai de disparition du carbone organique dissous; mais le résultat est similaire à celui obtenu avec l'essai au respiromètre. Le degré de minéralisation sera donc inférieur ou égal au degré minimal de biodégradation finale. Pour obtenir un tableau plus complet de la biodégradation finale (minéralisation et incorporation dans la biomasse), il faudrait analyser la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai (voir annexe 1). Le ^{14}C présent dans les matières particulaires consistera en ^{14}C incorporé dans la biomasse bactérienne et en ^{14}C sorbé sur les particules organiques.

2.3. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Si la substance de référence ne se dégrade pas au cours de la période prévue (pour l'aniline et le benzoate de sodium, généralement moins de deux semaines), la validité de l'essai est incertaine et demande à être vérifiée; sinon, l'essai peut aussi être répété avec un nouvel échantillon d'eau. À l'issue d'un essai tournant de la méthode, organisé par l'ISO, auquel sept laboratoires européens ont participé, les constantes de vitesse de dégradation adaptées de l'aniline s'échelonnaient entre 0,3 et 1,7 jour^{-1} , avec une moyenne de 0,8 jour^{-1} à 20 °C et un écart-type de $\pm 0,4 \text{ jour}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,9 \text{ jour}$). Les périodes de latence étaient généralement comprises entre un et sept jours. Les eaux examinées renfermaient une biomasse bactérienne correspondant à 10^3 - 10^4 unités formant colonie par ml. Les eaux riches en éléments nutritifs de l'Europe tempérée accusaient des vitesses de dégradation supérieures aux eaux oligotrophes de l'Europe septentrionale, probablement à cause d'une différence d'état trophique ou d'une exposition préalable à des substances chimiques.

La récupération totale (bilan massique) à la fin de l'expérience devrait se situer entre 90 % et 110 % pour les substances radio-marquées, tandis que le taux de récupération au début de l'expérience devrait être compris entre 70 % et 110 % pour les substances non marquées. Toutefois, ces gammes ne sont mentionnées qu'à titre indicatif et ne devraient pas servir de critère d'acceptation pour l'essai.

▼ **M1**3. **RAPPORT D'ESSAI**

Le type d'essai, à savoir pélagique ou en suspension de sédiments, doit être stipulé clairement dans le rapport d'essai, qui fournira également, au minimum, les informations suivantes:

Substance d'essai et substance(s) de référence:

- noms courants, noms chimiques (suivant la nomenclature recommandée par l'IUPAC et/ou le CAS), numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ^{14}C , dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence (voir paragraphes 1.5 et 1.6),
- noms chimiques, numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ^{14}C , dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes des substances servant d'étalon pour l'identification et la quantification des produits de transformation,
- pureté (impuretés) de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence,
- pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (le cas échéant).

Eau superficielle:

Il convient de fournir, au minimum, les informations suivantes sur l'échantillon d'eau prélevé:

- localisation et description du site de prélèvement et, si possible, son histoire en matière de contamination,
- date et heure du prélèvement de l'échantillon,
- éléments nutritifs (N total, ammonium, nitrite, nitrate, P total, orthophosphate dissous),
- profondeur du prélèvement,
- aspect de l'échantillon (couleur et turbidité, par exemple),
- carbone organique dissous et carbone organique total,
- demande biologique en oxygène,
- température et pH sur le lieu et à l'heure du prélèvement,
- oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente),
- salinité ou conductivité (dans le cas d'une eau de mer ou d'une eau saumâtre),
- solides en suspension (dans le cas d'un échantillon trouble),
- éventuellement, autres informations pertinentes sur le lieu de prélèvement au moment du prélèvement (par exemple, données actuelles ou antérieures sur le débit des cours d'eau ou les courants marins, présence d'importantes sources de rejets à proximité et nature des rejets, conditions météorologiques précédant le moment du prélèvement),

et, à titre facultatif:

- biomasse microbienne (comptage direct à l'orangé d'acridine ou unités formant colonie, par exemple),

▼ M1

- carbone minéral,
- estimation de la biomasse des algues d'après la concentration en chlorophylle a.

De surcroît, si l'essai est réalisé en suspension de sédiments, il faudrait fournir les renseignements suivants sur le sédiment:

- profondeur de prélèvement du sédiment,
- aspect du sédiment (coloré, boueux, vaseux ou sableux, par exemple),
- texture (pourcentages de sable grossier, de sable fin, de limon et d'argile, par exemple),
- poids sec en g/l des solides suspendus, concentration du carbone organique total ou mesure de la teneur en matière organique d'après la perte de poids à l'inflammation,
- pH,
- oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente).

Conditions expérimentales:

- temps écoulé entre le prélèvement de l'échantillon et son utilisation dans l'essai en laboratoire, stockage et traitement préalable de l'échantillon, dates auxquelles les études ont été menées,
- quantité de substance d'essai appliquée, concentration expérimentale et substance(s) de référence,
- méthode d'application de la substance d'essai, notamment utilisation de solvants, le cas échéant,
- volume d'eau superficielle utilisé, et de sédiment le cas échéant, et volume prélevé à chaque moment d'analyse,
- description du système expérimental utilisé.

Si l'obscurité ne s'impose pas, informations sur les paramètres de la lumière diffuse,

- informations sur la ou les méthodes utilisées pour préparer des témoins stériles (température, durée et nombre d'autoclavages, par exemple),
- température d'incubation,
- renseignements sur les techniques analytiques et la ou les méthodes appliquées pour les mesures radiochimiques, la vérification du bilan massique et la détermination de la répartition entre les phases (le cas échéant),
- nombre d'expériences identiques.

Résultats:

- pourcentages de récupération (voir paragraphe 1.7.1),
- répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées, y compris les seuils de détection et de quantification (voir paragraphe 1.7.2),

▼ M1

- toutes les données mesurées (y compris les heures de prélèvement), les valeurs calculées présentées sous forme de tableau et les courbes de dégradation; pour chaque concentration expérimentale et chaque flacon en double, indiquer le coefficient de corrélation linéaire de la pente du tracé logarithmique, la durée estimée de la phase de latence, une constante de vitesse de premier ordre ou de pseudo-premier ordre (si possible) et la demi-vie de dégradation correspondante (ou le temps de demi-vie, $t_{1/2}$),
- consigner les valeurs importantes telles que les moyennes des résultats observés pour chaque double, par exemple la longueur de la phase de latence, la constante de vitesse de dégradation et la demi-vie de dégradation (ou $t_{1/2}$),
- déterminer si le système est adapté ou non, d'après l'aspect de la courbe de dégradation et l'influence éventuelle de la concentration d'essai,
- résultats de la vérification du bilan massique final et résultats des mesures de la répartition entre les phases (le cas échéant),
- fraction de ^{14}C minéralisé et, si des analyses spécifiques ont été menées, niveau final de la dégradation primaire,
- identification, concentration molaire et pourcentage des principaux produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), le cas échéant,
- proposition d'un chemin réactionnel pour la transformation, s'il y a lieu,
- analyse des résultats.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test
2. ISO/DIS 14592-1 (1999). Qualité de l'eau — évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations — partie 1: essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.
3. Méthode d'essai C.23. Transformation aérobie et anaérobie dans le sol.
4. Méthode d'essai C.24. Transformation aérobie et anaérobie dans les systèmes sédimentaires aquatiques.
5. OCDE (1993). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
6. ISO 8245 (1999). Qualité de l'eau — lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et du carbone organique dissous (COD).
7. ISO 10634 (1995). Qualité de l'eau — lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. N° 22 (to be published summer 2000).

▼ M1

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.*47, 394-401.
10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274-283.
11. ISO/CD 14592-1 (1999). Qualité de l'eau — évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations — partie 1: essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

▼ **M1***Appendice 1***Répartition du ^{14}C entre les phases**

Afin de contrôler le procédé employé, il convient de compléter les mesures systématiques de l'activité totale du ^{14}C organique (AOT) résiduel par des mesures du bilan massique comportant une détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$ émis après piégeage dans un absorbeur (voir annexe 3). En soi, la formation de $^{14}\text{CO}_2$ constitue une preuve directe de biodégradation, par opposition à la dégradation abiotique ou à d'autres mécanismes de disparition, tels que la volatilisation et la sorption. D'autres renseignements utiles caractérisant la biodégradabilité peuvent être tirés des mesures de la répartition de l'AOT entre la phase dissoute (activité du ^{14}C organique dissous, AOD) et la phase particulaire (activité du ^{14}C organique particulaire, AOP), après la séparation des particules par filtration sur membrane ou centrifugation. L'AOP se rapporte à la substance d'essai sorbée sur la biomasse microbienne et sur d'autres particules ainsi qu'au carbone de la substance d'essai qui a été mobilisé pour synthétiser de nouveaux matériaux cellulaires et incorporé de ce fait dans la fraction particulaire de la biomasse. La formation du ^{14}C organique dissous peut être estimée d'après l'AOD à la fin de la biodégradation (plateau sur la courbe de dégradation en fonction du temps).

On estime la répartition du ^{14}C résiduel entre les phases dans des échantillons choisis en filtrant les échantillons sur un filtre à membrane composé d'un matériau qui n'adsorbe, le cas échéant, que des quantités négligeables de la substance d'essai (les filtres en polycarbonate, par exemple, conviennent) et dont les pores mesurent 0,22 μm ou 0,45 μm . Si la sorption de la substance d'essai sur le filtre est trop importante pour être négligée (à vérifier avant l'expérience), la filtration peut être remplacée par une centrifugation à grande vitesse (2 000 g; 10 min).

Le filtrat ou le centrifugat sont traités comme les échantillons non filtrés (voir à l'annexe 3). Les membranes des filtres sont dissoutes dans un liquide à scintillation approprié, et le comptage s'effectue comme d'habitude, en principe uniquement à l'aide de la méthode du quotient avec un étalon externe pour corriger l'extinction, ou à l'aide d'un dispositif oxydant l'échantillon. Si l'on a utilisé la centrifugation, il faut de nouveau suspendre la boulette formée par la fraction particulaire dans 1 à 2 ml d'eau distillée et transférer le tout dans un petit tube à scintillation. Après deux rinçages du tube à centrifuger avec 1 ml d'eau distillée, l'eau de rinçage est transférée dans le petit tube à scintillation. Si nécessaire, la suspension peut être incorporée à un gel pour le comptage par scintillation liquide.

▼ **M1***Appendice 2***Procédé semi-continu**

Il est parfois nécessaire de prolonger l'incubation durant plusieurs mois afin de dégrader suffisamment les substances récalcitrantes. L'essai ne doit normalement pas dépasser 60 jours, sauf si les caractéristiques de l'échantillon d'eau original sont maintenues grâce au renouvellement de la suspension d'essai. Cependant, la durée de l'essai peut être prolongée jusqu'à 90 jours maximum sans renouvellement de la suspension d'essai si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours.

Si l'incubation couvre une longue période, la diversité de la flore microbienne risque de s'amenuiser, du fait de divers mécanismes de disparition et de l'appauvrissement possible de l'échantillon d'eau en éléments nutritifs essentiels et en substrats carbonés primaires. Il est donc recommandé de recourir à l'essai semi-continu pour déterminer correctement la vitesse de dégradation des substances qui se dégradent lentement. L'essai devrait débuter par un procédé semi-continu si des données expérimentales laissent supposer qu'une période d'incubation de trois mois est nécessaire pour que la substance se dégrade à 20 %. Sinon, l'essai en lots peut être converti en essai semi-continu si la substance d'essai ne s'est pas dégradée au terme d'un essai en lots mené sur une soixantaine de jours. Il est possible de mettre fin à un essai semi-continu et de poursuivre l'expérience selon le procédé en lots si une dégradation substantielle a été enregistrée (> 20 %, par exemple).

Dans l'essai semi-continu, toutes les deux semaines, environ un tiers du volume de la suspension d'essai est remplacé par un volume d'eau venant d'être prélevé, dans lequel a été ajoutée la quantité requise de substance d'essai pour rétablir sa concentration initiale. De la même façon, on ajoute la quantité nécessaire de sédiment dans l'eau de remplacement pour rétablir la concentration initiale de sédiment (entre 0,01 et 1 g/l) si l'on effectue l'essai facultatif en suspension de sédiments. Si l'essai est mené avec des sédiments solides en suspension, il importe que le système demeure totalement suspendu et ce, également lors du renouvellement de l'eau, et il convient d'appliquer un temps de séjour identique pour les solides et l'eau, sinon on risquerait de perdre la similarité voulue avec un système aqueux homogène sans phases fixes. C'est pourquoi, il est préférable que la concentration initiale des sédiments suspendus se situe dans la partie inférieure de l'intervalle spécifié lorsqu'on utilise un procédé semi-continu.

L'ajout de la substance d'essai, tel qu'il est prescrit, implique que le renouvellement partiel de la suspension d'essai n'entraîne pas de dépassement de la concentration initiale de la substance d'essai, et que l'on évite par conséquent l'adaptation couramment observée avec des concentrations élevées de la substance d'essai. Le procédé prévoyant une réinoculation et une compensation des carences en éléments nutritifs et en substrats primaires, la diversité microbienne originale est rétablie et la durée de l'essai peut, en principe, être prolongée à l'infini. Lorsqu'on applique le procédé semi-continu, il est important de noter que la concentration résiduelle de la substance d'essai doit être corrigée en fonction des quantités de substance d'essai ajoutées et ôtées à chaque renouvellement. La concentration totale de la substance d'essai et sa concentration à l'état dissous peuvent être utilisées de façon interchangeable pour les composés peu sujets à la sorption. La sorption est négligeable (< 5 %) dans les conditions spécifiées (0,1-1 g solides/l) pour les substances dont le $\log K_{oe} < 3$ (valable pour les substances neutres, lipophiles). L'exemple de calcul présenté ci-dessous illustre ce qui précède. En gros, 0,1 g/l de solides correspond à 10 mg de carbone par litre (fraction de carbone $f_C = 0,01$). Soit:

$\log K_{oe}$ (de la substance d'essai) = 3

$$K_{co} = 0,42 \times K_{oe}$$

Coefficient de partage, $K_d = f_C \times K_{co}$

alors, la fraction dissoute de la concentration totale (C-eau (C_e)/C-total (C_t)) est égale à:

$$C_e/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1/(1 + K_{co} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$$

▼ **M1***Appendice 3***Détermination du $^{14}\text{CO}_2$** **Détermination indirecte du $^{14}\text{CO}_2$**

Pour les mesures systématiques, la méthode indirecte est normalement la plus rapide et la plus précise, si la substance d'essai est non volatile et ne se transforme pas en produits volatils. Pour ce faire, il suffit de transférer des échantillons non filtrés, d'un volume de 5 ml, par exemple, dans des tubes à scintillation. L'activité initiale adéquate des échantillons est comprise entre 5 000 dpm et 10 000 dpm (80-170 Bq) et l'activité initiale minimale est de quelque 1 000 dpm. Le CO_2 doit être extrait après acidification à pH 2-3 avec une ou deux gouttes d' H_3PO_4 ou d' HCl concentrés. L'extraction du CO_2 peut se faire par barbotage à l'air durant une demi-heure à une heure. Sinon, les flacons peuvent être agités vigoureusement durant une à deux heures (par exemple, sur un agitateur à microplaque) ou plus doucement, mais jusqu'au lendemain. Il faut vérifier l'efficacité du procédé d'extraction du CO_2 (en prolongeant l'aération ou la durée de l'agitation). Ensuite, un liquide à scintillation approprié au comptage des échantillons aqueux est ajouté et l'échantillon est homogénéisé au moyen d'un mélangeur rotatif; on détermine la radioactivité par comptage en scintillation liquide en retranchant l'activité de fond relevée sur les témoins (F_B). À moins que l'eau d'essai ne soit très colorée ou renferme une concentration élevée de particules, les échantillons présentent normalement une extinction uniforme et il suffit de corriger l'extinction à l'aide d'un étalon externe. Si l'eau d'essai est très colorée, il peut être nécessaire de corriger l'extinction par ajout d'un étalon interne. Si la concentration des particules est élevée, il peut s'avérer impossible d'obtenir une solution ou un gel homogène, ou la variation d'extinction entre les échantillons risque d'être importante. Dans ce cas, la méthode de comptage décrite ci-après pour les boues d'essai peut être utilisée. Si l'essai est mené en suspension de sédiments, on peut mesurer le $^{14}\text{CO}_2$ indirectement en prenant un échantillon homogène de 10 ml de l'eau/suspension d'essai et en séparant les phases par centrifugation à une vitesse appropriée (par exemple à 40 000 m/s^2 durant 15 min). La phase aqueuse doit ensuite être traitée comme décrit plus haut. On détermine l'activité du ^{14}C de la phase particulaire (AOP) en suspendant de nouveau le sédiment dans un petit volume d'eau distillée, en le transférant dans des tubes à scintillation et en ajoutant un liquide à scintillation de façon à obtenir un gel (il existe des liquides à scintillation spécialement destinés à cet usage). Selon la nature des particules (par exemple, leur teneur en matières organiques), il peut être possible de faire digérer l'échantillon par un solubilisant pour tissus en le laissant agir jusqu'au lendemain et de l'homogénéiser ensuite avec un mélangeur rotatif, avant d'ajouter le liquide à scintillation. Sinon, l'AOP peut être déterminée par combustion en excès d'oxygène au moyen d'un dispositif oxydant l'échantillon. Des étalons internes doivent toujours être inclus lors du comptage, et il est parfois nécessaire de corriger l'extinction en ajoutant un étalon interne pour chaque échantillon.

Détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$

Si le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé est mesuré directement, il faut prévoir un plus grand nombre de flacons au début de l'essai, prélever les flacons d'essai à chaque moment de mesure, acidifier leur contenu à pH 2-3 et recueillir le $^{14}\text{CO}_2$ dans un absorbeur interne (disposé dans chaque flacon d'essai au début de l'essai) ou externe. Un milieu absorbant alcalin (par exemple, une solution 1 N de NaOH ou une pastille de NaOH), ou constitué d'éthanolamine ou à base d'éthanolamine, ainsi que les absorbeurs vendus dans le commerce peuvent être utilisés. Pour la mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$, les flacons doivent être fermés au moyen de bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple.

▼ M1

Figure 1a

Exemple d'un tracé arithmétique des résultats (activité résiduelle en fonction du temps)

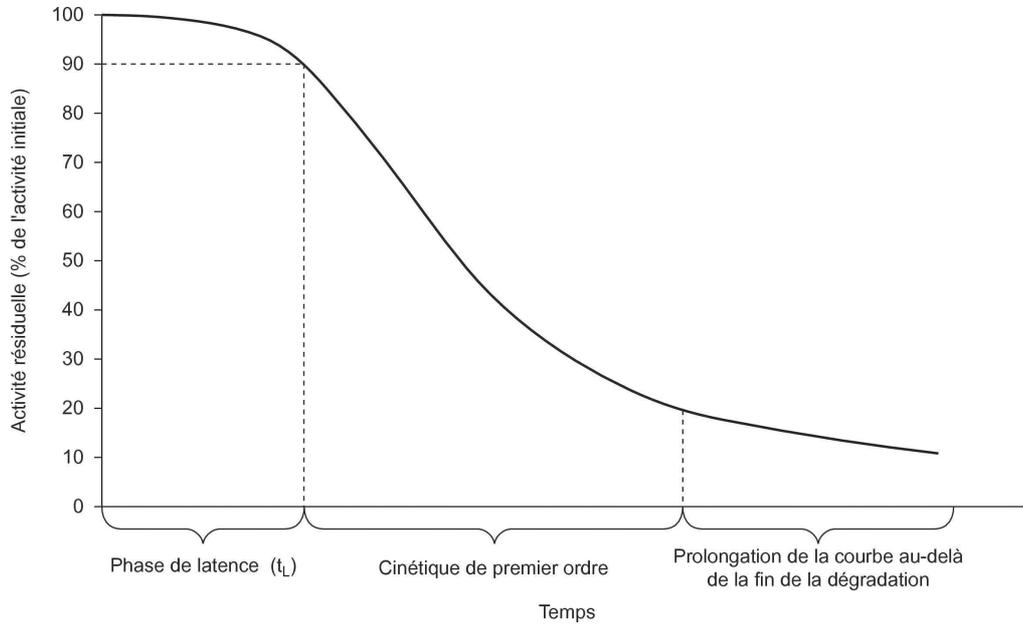
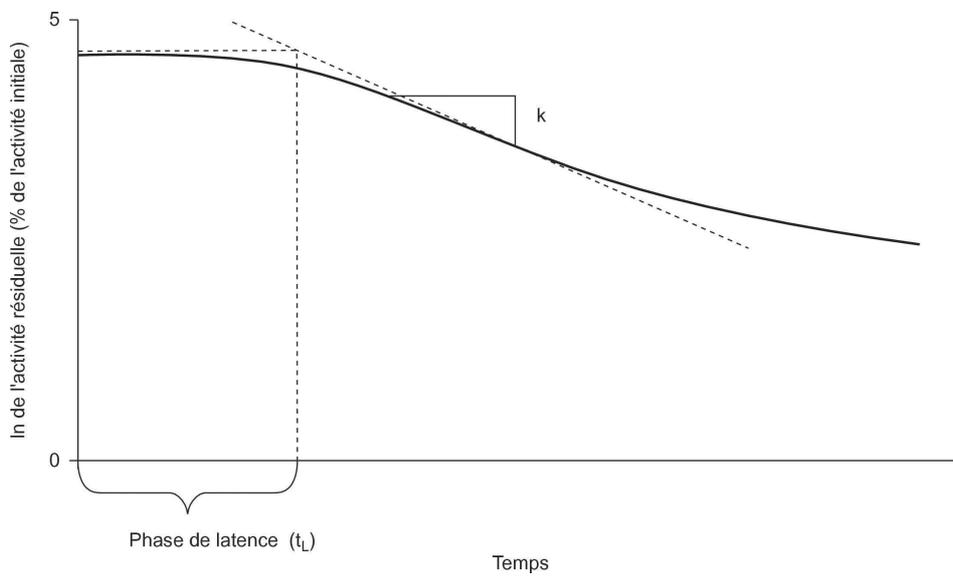


Figure 1b

Exemple de tracé semi-logarithmique des résultats (ln de l'activité résiduelle en fonction du temps)



▼ M1C.26. **LEMNA SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE**1. **MÉTHODE**

La présente méthode est équivalente à la ligne directrice TG 221 (2006) de l'OCDE (1). Il existe un vaste consensus des autorités de l'UE sur le fait que l'essai sur les Lemna constitue une solution de substitution acceptable à un essai sur les algues pour les substances fortement colorées (2) (3).

1.1. **INTRODUCTION**

Cette méthode d'essai est destinée à évaluer la toxicité de substances sur des plantes dulcicoles du genre *Lemna* (lentille d'eau). Conçue à partir de lignes directrices existantes (4)(5)(6)(7)(8)(9), elle a fait l'objet de modifications afin de tenir compte des dernières avancées en recherche et des consultations d'experts sur un certain nombre de points essentiels. La méthode proposée ici a été validée par un essai tournant international (10).

Cette méthode d'essai décrit des essais de toxicité sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, deux espèces abondamment étudiées et visées par les références susmentionnées. La taxonomie des espèces du genre *Lemna* est complexe, notamment à cause de l'existence des nombreux phénotypes. Bien qu'il puisse y avoir une variation génétique pour la réaction des espèces de *Lemna* aux toxiques, nous ne sommes pas encore en mesure de recommander l'usage d'un clone particulier pour cette méthode d'essai, faute de données suffisantes sur cette source de variabilité. Notons que cet essai n'est pas réalisé dans des conditions axéniques, mais qu'à différentes étapes du mode opératoire, il inclut des mesures permettant de limiter au minimum la contamination par d'autres organismes.

Les procédés avec renouvellement (semi-statique et à écoulement continu dit «dynamique») et sans renouvellement (statique) de la solution expérimentale sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, on envisagera d'appliquer les méthodes semi-statique et dynamique, par exemple pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, photodégradation, précipitation ou biodégradation. Des orientations supplémentaires sont fournies dans la référence (11).

1.2. **DÉFINITIONS**

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode d'essai:

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse est mesurée indirectement, en général par le nombre de thalles et la superficie des thalles, si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces paramètres.

Chlorose: jaunissement du tissu des thalles.

Clone: organisme ou cellule issu d'un seul individu par reproduction asexuée. D'où l'identité génétique entre les individus issus d'un même clone.

Colonie: agrégat de thalles mères et filles (généralement 2 à 4) attachés les uns aux autres. Quelquefois désignée par le terme «plante».

▼ M1

CE_x: concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Lemna* durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle dépasse la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_c, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable utilisée, par exemple CE_t (nombre de thalles).

Dynamique: qualifie un essai dans lequel les solutions expérimentales sont renouvelées en continu.

Thalle: désigne l'appareil végétatif de la lentille d'eau réduit à une petite lame ovale individuelle. Il représente la plus petite unité (individu) capable de reproduction.

Gibbosité: bosse ou renflement apparaissant sur les thalles.

Croissance: augmentation de la variable mesurée, par exemple le nombre de thalles, le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles, au cours de l'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance exerce un effet statistiquement significatif de réduction de croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Variable mesurée: tout type de variable mesurée pour exprimer l'effet étudié au cours de l'essai par une ou plusieurs variables étudiées. Dans cette méthode, le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais et le poids sec sont des variables mesurées.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu (des thalles) mort (c'est-à-dire blanc ou gorgé d'eau).

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Phénotype: caractéristiques observables d'un organisme, déterminées par l'interaction de ses gènes avec l'environnement.

Variables étudiées: variables permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans cette méthode, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de variables mesurées telles que le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais ou le poids sec.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai sans renouvellement de la solution d'essai durant l'essai.

▼ **M1**

Effet étudié: décrit le facteur général qui sera modifié, par rapport au témoin, par la substance d'essai. Dans cette méthode, l'effet étudié est l'inhibition de la croissance qui peut être exprimée par différentes variables étudiées déduites d'une ou de plusieurs variables mesurées.

Milieu expérimental: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées à la substance d'essai. La substance d'essai sera normalement dissoute dans le milieu expérimental.

Rendement: valeur de la variable mesurée choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition, moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition.

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Des monocultures du genre *Lemna*, en phase de croissance exponentielle, sont exposées à différentes concentrations de la substance d'essai sur une période de sept jours. Cet essai vise à quantifier les effets de la substance sur la multiplication végétative des lentilles d'eau durant cette période, d'après l'évaluation de plusieurs variables choisies. Le nombre de thalles représente la première variable mesurée, mais on en détermine au moins une autre (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) car certaines substances sont susceptibles d'avoir un impact beaucoup plus prononcé sur des variables autres que le nombre de thalles. Afin de quantifier les effets de la substance, la croissance des lentilles d'eau dans les solutions expérimentales est comparée à celle des témoins, et la concentration induisant un pourcentage défini x % d'inhibition de la croissance (par exemple, 50 %) est déterminée et exprimée sous la forme de CE_x (par exemple, CE_{50}).

Dans cet essai, l'effet observé est l'inhibition de la croissance, exprimé en termes d'accroissement logarithmique de la variable mesurée (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple, 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple, $C_{50}E_t$).

Cette méthode d'essai comporte également une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur des variables mesurées à la fin de la période d'exposition et la valeur des variables mesurées au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple, 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de C_xE_r (par exemple, $C_{50}E_r$).

En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

1.4. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental.

▼ M1

Les informations sur la substance d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a , le K_{oe} , la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de la substance d'essai risquent de se produire durant la période de l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières afin de limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité de la substance d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu expérimental ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai.

Lorsque la maîtrise du pH du milieu expérimental est particulièrement importante, par exemple lorsqu'on teste des métaux ou des substances hydrolytiquement instables, il est recommandé d'ajouter un tampon au milieu de croissance (voir premier alinéa du paragraphe 1.7.4). D'autres indications sur le traitement des substances qui se prêtent difficilement à cet essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont données dans la référence (11).

1.5. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence telles que le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai tournant international (10) peuvent servir à vérifier le procédé expérimental. Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est mené moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance d'essai.

1.6. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valable, le temps de dédoublement du nombre de thalles chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures), ce qui correspond approximativement à une multiplication par sept de ce nombre en sept jours et à un taux de croissance spécifique moyen de 0,275 par jour. Si l'on utilise le milieu et les conditions expérimentales décrits dans cette méthode d'essai, ce critère peut être atteint avec une méthode d'essai statique (8). Ce critère devrait aussi pouvoir être rempli dans des conditions semi-statiques et dynamiques. Le calcul du temps de dédoublement est exposé au paragraphe 2.1.

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**1.7.1. Appareillage**

Tout le matériel entrant en contact avec le milieu expérimental doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et exempte de tous les contaminants chimiques risquant d'être lessivés dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment larges pour permettre aux thalles des différentes colonies dans les récipients témoins de croître sans se recouvrir à la fin de l'essai. Il importe peu que les racines touchent le fond des récipients d'essai, mais il est conseillé d'utiliser des récipients d'essai d'une profondeur minimale de 20 mm et d'un volume minimal de 100 ml. Tout récipient répondant à ces critères peut être utilisé. Des béciers en verre, des cristallisoirs et des boîtes de Petri en verre aux dimensions appropriées se sont avérés adéquats. Les récipients d'essai seront couverts pour minimiser l'évaporation et la contamination accidentelle, tout en autorisant les échanges nécessaires avec l'air. Les récipients d'essai, et en particulier leurs couvercles, ne doivent pas réduire l'intensité lumineuse ni modifier les caractéristiques spectrales de la lumière.

▼ M1

Les récipients expérimentaux et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. Il faut pouvoir régler l'éclairage et la température et les maintenir à un niveau constant (voir paragraphe 1.7.8).

1.7.2. Organisme expérimental

Cet essai se pratique sur *Lemna gibba* ou *Lemna minor*. L'appendice 1 fournit une brève description condensée des espèces de lentilles d'eau ayant servi à des essais de toxicité. Le matériel végétal peut être obtenu auprès d'une collection de cultures d'un autre laboratoire ou être récolté sur le terrain. Dans ce dernier cas, les plantes doivent être maintenues dans le même milieu que celui qui servira à l'essai durant au moins huit semaines avant leur utilisation. Les cultures de départ ne seront prélevées que sur des sites manifestement non contaminés. Si les cultures proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, elles seront également maintenues dans le même milieu que celui de l'essai durant au moins trois semaines. La source du matériel végétal ainsi que l'espèce et le clone (s'il est connu) utilisés pour l'essai doivent toujours figurer sur le rapport.

Il convient d'utiliser des monocultures visiblement non contaminées par d'autres organismes tels que des algues et des protozoaires. Les représentants sains de *L. minor* forment des colonies de deux à cinq thalles tandis que les colonies saines de *L. gibba* peuvent comprendre jusqu'à sept thalles.

La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai sont susceptibles d'avoir une influence sensible sur le résultat de l'essai, et les plantes doivent par conséquent être choisies avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). Une fréquence élevée de colonies comprenant au moins deux thalles atteste la bonne qualité des cultures. Un nombre important de thalles uniques indique que les plantes vivent dans des conditions de stress, telles que carence en éléments nutritifs, et le matériel végétal issu de ces cultures ne peut servir à l'essai.

1.7.3. Culture

Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple, lorsque aucun essai n'est prévu sur les *Lemna* durant un certain temps), les cultures peuvent être maintenues à une température et sous un éclairage réduits (4-10 °C). L'appendice 2 fournit des précisions sur la culture. En cas de contamination visible par des algues ou d'autres organismes, il faut stériliser en surface un sous-échantillon de thalles de *Lemna* et le transférer dans un milieu nouvellement préparé (voir appendice 2). Dans cette éventualité, le reste de la culture contaminée est à éliminer.

Au moins sept jours avant l'essai, un nombre suffisant de colonies est transféré aseptiquement dans un milieu frais stérile et cultivé durant sept à dix jours dans les conditions de l'essai.

1.7.4. Milieu expérimental

Les différents milieux recommandés pour *Lemna minor* et *Lemna gibba* sont décrits ci-après. La prudence sera de rigueur en ce qui concerne l'ajout d'un tampon au milieu d'essai (MOPS [acide 4-morpholinepropanesulfonique, numéro CAS: 1132-61-2; numéro EINECS: 214-478-5] au milieu de *L. minor*, et NaHCO₃ au milieu de *L. gibba*) si l'on soupçonne le tampon de réagir avec la substance d'essai et d'influencer l'expression de sa toxicité. Le milieu de Steinberg (12) est acceptable pour autant que les critères de validité soient respectés.

▼ M1

On préconise de cultiver et de tester *L. minor* sur une version modifiée du milieu de croissance pour *Lemna* établi par la norme suédoise (SIS). La composition de cette version modifiée est indiquée à l'appendice 3.

Le milieu de croissance 20X — AAP, décrit à l'appendice 3, est recommandé pour la culture et l'essai de *L. gibba*.

Le milieu de Steinberg, décrit à l'appendice 3, convient à *L. minor*, mais peut aussi être employé pour *L. gibba*, à condition que les critères de validité soient respectés.

1.7.5. Solutions expérimentales

Les solutions expérimentales sont généralement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même préparée par dissolution de la substance dans le milieu de croissance.

La plus haute concentration testée de la substance d'essai ne doit normalement pas dépasser l'hydrosolubilité de la substance dans les conditions de l'essai. Il est à noter toutefois que les espèces du genre *Lemna* flottent à la surface et risquent d'être exposées à des substances qui s'accumulent à l'interface eau-air (par exemple, des substances peu solubles dans l'eau ou hydrophobes ou des tensio-actifs). Dans ces circonstances, l'exposition résultera de substances autres que celles qui sont en solution, de sorte que les concentrations expérimentales pourraient, suivant les caractéristiques de la substance d'essai, dépasser la solubilité dans l'eau. Pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, il peut être nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion de la substance au moyen d'un solvant organique ou d'un dispersant, afin de faciliter l'ajout de quantités précises de substance d'essai au milieu expérimental et de favoriser sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/L; elle doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (11) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

1.7.6. Groupes traités et témoins

Il est utile de cerner la toxicité de la substance d'essai à l'égard de *Lemna*, par exemple à l'aide d'un essai de détermination de l'ordre de grandeur, afin d'établir des concentrations expérimentales pertinentes. L'essai de toxicité proprement dit doit comprendre au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est préférable que les concentrations expérimentales ne soient pas séparées par un facteur supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente nulle. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il faut réaliser au moins trois expériences identiques à chaque concentration.

Le choix de la gamme des concentrations d'essai (de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ou de l'essai de toxicité) doit tenir compte des aspects suivants:

▼ **M1**

- pour déterminer la CE_x , les concentrations expérimentales doivent entourer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50} , la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50} . Si la CE_{50} sort de la gamme des concentrations expérimentales, les intervalles de confiance seront larges et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle,
- s'il s'agit d'estimer la CME0 et la CSEO, la plus petite concentration expérimentale doit être suffisamment basse pour que la croissance des lentilles d'eau ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance soit sensiblement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété à une gamme de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée n'atteigne la limite de solubilité ou la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).

Chaque essai doit inclure des témoins sans substance d'essai, mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, du nombre de thalles et de colonies, des conditions environnementales et du procédé expérimental. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant la substance d'essai. Le nombre de récipients témoins identiques (et de témoins contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal, et idéalement deux fois supérieur, au nombre de récipients d'essai utilisés à chaque concentration expérimentale.

Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, la conception de l'essai peut être modifiée pour augmenter le nombre de concentrations et diminuer le nombre d'expériences identiques par concentration. Toutefois, le nombre de témoins identiques doit être au moins égal à trois.

1.7.7. **Exposition**

Des colonies formées de 2 à 4 thalles visibles sont prélevées dans la culture de l'inoculum et réparties au hasard dans les récipients d'essai dans des conditions d'asepsie. Chaque récipient d'essai doit contenir 9 à 12 thalles au total. Le nombre de thalles et de colonies doit être identique dans chaque récipient d'essai. L'expérience acquise avec cette méthode et l'essai tournant montrent que l'utilisation de trois expériences identiques par traitement, comprenant chacune 9 à 12 thalles au départ, suffit pour détecter des différences de croissance entre les traitements équivalant à environ 4 à 7 % d'inhibition, si celles-ci sont calculées d'après le taux de croissance, et de 10 à 15 % si elles sont calculées d'après le rendement (10).

L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations (ou plus souvent de remettre en place les récipients) est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire.

▼ M1

Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration de la substance d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (sept jours), on recommande la méthode semi-statistique. Dans ce cas, les colonies doivent être exposées au moins deux fois durant l'essai (par exemple, les troisième et cinquième jours) à des solutions d'essai et à des solutions témoins nouvellement préparées. La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité de la substance d'essai: une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de substances très instables ou volatiles. Certaines circonstances appellent une méthode dynamique (11)-(13).

La voie d'exposition par application foliaire (pulvérisation) n'est pas reprise dans cette méthode d'essai, mais la référence (14) donne des informations à ce sujet.

1.7.8. Conditions d'incubation

On applique un éclairage continu à fluorescence blanche, chaude ou froide, afin d'obtenir une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) à des points situés à la même distance de la source lumineuse que les thalles de *Lemna* (équivalant à 6 500-10 000 lux). Tout écart par rapport à l'intensité lumineuse choisie ne doit pas dépasser $\pm 15\%$ dans la zone de l'essai. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, affectera la valeur mesurée. Les capteurs sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

La température des récipients d'essai est maintenue à $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Le pH du milieu témoin ne peut augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité peut être démontré. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment avec des substances instables et des métaux. La référence (11) fournit des indications supplémentaires à ce sujet.

1.7.9. Durée

L'essai prend fin sept jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

1.7.10. Mesures et déterminations analytiques

Au début de l'essai, on dénombre les thalles présents dans les récipients d'essai et on consigne ces valeurs en prenant soin de compter les thalles émergents bien visibles. Les nombres de thalles paraissant normaux ou anormaux sont déterminés au début de l'essai, au moins une fois tous les trois jours durant la période d'exposition (c'est-à-dire à au moins deux occasions au cours de la période de sept jours) et à la fin de l'essai. Il y a lieu de noter les changements affectant le développement des plantes, par exemple en ce qui concerne la taille et l'aspect des thalles, les signes de nécrose, de chlorose ou les gibbosités, la fragmentation des colonies ou la diminution de leur flottabilité ainsi que la longueur et l'aspect des racines. Les caractéristiques significatives du milieu d'essai (par exemple, la présence de matières non dissoutes, le développement d'algues dans les récipients d'essai) doivent également être rapportées.

▼ M1

Durant l'essai, en plus de la détermination du nombre de thalles, on mesure aussi les effets de la substance d'essai sur une ou plusieurs des variables suivantes:

- i) superficie totale des thalles;
- ii) poids sec;
- iii) poids frais.

La superficie totale des thalles présente l'avantage de pouvoir être déterminée pour chaque récipient traité et témoin au début, pendant et à la fin de l'essai. Le poids sec ou frais est déterminé au début de l'essai à partir d'un échantillon de la culture de l'inoculum représentatif du matériel utilisé pour entamer l'essai et à la fin de l'essai avec le matériel végétal de chaque récipient traité et de chaque récipient témoin. Si la superficie des thalles n'est pas mesurée, le poids sec est préférable au poids frais.

La superficie totale des thalles, le poids sec et le poids frais peuvent être déterminés comme suit:

- i) *superficie totale des thalles*: la superficie totale des thalles de toutes les colonies peut être déterminée par analyse de l'image. On saisit la silhouette du récipient expérimental et des plantes avec une caméra vidéo (en plaçant le récipient sur une boîte lumineuse) et on numérise l'image obtenue. Un étalonnage réalisé avec des formes planes de superficie connue permet ensuite de déterminer la superficie totale des thalles dans un récipient d'essai. On veillera à éviter toute interférence avec le bord du récipient d'essai. Une autre méthode plus laborieuse consiste à photocopier les récipients d'essai contenant les plantes, à découper la silhouette résultant des colonies et à déterminer leur superficie à l'aide d'un analyseur de la surface foliaire ou de papier millimétré. D'autres techniques (par exemple, le quotient du poids de la silhouette découpée dans le papier par le poids d'un morceau de papier de superficie connue) conviennent également;
- ii) *poids sec*: toutes les colonies sont prélevées dans chaque récipient d'essai et rincées avec de l'eau distillée ou désionisée. Elles sont déposées sur un buvard qui absorbe l'excès d'eau et séchées à 60 °C jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids constant. Tous les fragments de racines doivent être inclus. Le poids sec doit être exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg;
- iii) *poids frais*: toutes les colonies sont transférées dans des tubes de polystyrène (ou d'un autre matériau inerte) tarés et percés de petits trous (1 mm) dans leur fond arrondi. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 tpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes contenant les colonies ainsi séchées sont repesés, et le poids frais est calculé par déduction de la tare du tube.

1.7.10.1. *Fréquence des mesures et des déterminations analytiques*

Avec le procédé statique, le pH de chaque récipient traité doit être mesuré au début et à la fin de l'essai. Si le procédé est semi-statique, le pH est mesuré dans chaque lot de «nouvelle» solution expérimentale avant chaque renouvellement ainsi que dans les solutions «utilisées» correspondantes.

▼ M1

L'intensité lumineuse est mesurée dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points situés à la même distance de la source de lumière que les thalles de *Lemma*, et ce au moins une fois au cours de l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce.

Durant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées à intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.

Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que la concentration de la substance d'essai ne reste pas dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement (voir troisième alinéa du paragraphe 1.7.7). Néanmoins, pour les essais où la concentration de la substance d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations expérimentales maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un seul des récipients identiques de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les récipients traités de manière identique).

Un régime de prélèvement identique à celui décrit pour les essais semi-statiques pourra être appliqué aux essais dynamiques, avec une analyse au début, au milieu et à la fin de l'essai, mais sans l'analyse des solutions «utilisées» qui ne se justifie pas dans ce cas. Dans ce type d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai ou de la solution mère de la substance d'essai doit être contrôlé quotidiennement.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart par rapport à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à $\pm 20\%$, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration de la substance d'essai (11).

1.7.11. Essai limite

Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut effectuer un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être doublé. La croissance des lentilles d'eau dans le groupe témoin et dans le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

▼ M1**2. RÉSULTATS ET RAPPORT****2.1. TEMPS DE DOUBLEMENT**

La formule suivante, appliquée avec les données provenant des récipients témoins, permet de déterminer le temps de doublement (T_d) du nombre de thalles et de vérifier si l'étude respecte ce critère de validité (paragraphe 1.6):

$$T_d = \ln 2/\mu$$

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des deux premiers alinéas du paragraphe 2.2.1.

2.2. VARIABLES ÉTUDIÉES

Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance d'essai sur la multiplication végétative de *Lemma*. Cette méthode d'essai décrit deux variables, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires des pays membres. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables dans tous les pays membres, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées a) et b) définies ci-dessous.

a) taux de croissance spécifique moyen: cette variable étudiée est calculée d'après les changements affectant, d'une part, les logarithmes du nombre de thalles et, d'autre part, les logarithmes d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) en fonction du temps (exprimé en jours), chez les témoins et dans chaque groupe traité. Elle est quelquefois appelée «taux de croissance relatif» (15).

b) rendement: cette variable étudiée est calculée d'après les modifications du nombre de thalles et d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) chez les témoins et dans chaque groupe traité, jusqu'à la fin de l'essai.

Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x fondées sur le taux de croissance spécifique moyen ($C_x E_t$) seront généralement supérieures à celles fondées sur le rendement ($C_x E_r$), si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont appliquées, en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur le schéma général de croissance exponentielle des lentilles d'eau dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats fondés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La $C_x E_r$ dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce de lentille d'eau utilisée dans chaque essai et du taux de croissance spécifique maximal, susceptible de varier d'une espèce à une autre, voire d'un clone à l'autre. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité de différentes espèces, voire de différents clones de lentilles d'eau. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode d'essai propose également des estimations fondées sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays

▼ M1

Les estimations de la toxicité doivent reposer sur le nombre de thalles ainsi que sur une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais), parce que certaines substances peuvent avoir un effet bien plus prononcé sur une variable autre que le nombre de thalles, qui pourrait ne pas être détecté par le seul calcul du nombre de thalles.

On dresse un tableau réunissant le nombre de thalles et toute autre variable mesurée (c'est à dire superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) ainsi que les concentrations de la substance d'essai relevées à chaque mesure. Les analyses ultérieures, par exemple pour estimer la CMEO, la CSEO ou la CE_x, doivent s'appuyer sur les valeurs de chaque expérience identique d'un même essai et non sur les moyennes calculées pour chaque groupe traité.

2.2.1. Taux de croissance spécifique moyen

Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé en fonction de l'accroissement logarithmique des variables de la croissance — nombre de thalles et une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) — au moyen de la formule ci-dessous pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

où:

- μ_{i-j} : taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j,
- N_i : variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i,
- N_j : variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps j,
- t: période de temps comprise entre i et j.

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration des groupes traités et des témoins, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance. Évaluer également le taux de croissance section par section, afin d'apprécier les effets de la substance d'essai durant la période d'exposition (par exemple, en analysant les courbes de croissance log-transformées). Un taux de croissance section par section sensiblement différent du taux de croissance moyen montre qu'il y a un écart par rapport à la croissance exponentielle constante, écart qui réclame un examen attentif des courbes de croissance. Dans ce cas, une approche prudente consisterait à comparer les taux de croissance spécifiques des cultures traitées durant la période d'inhibition maximale avec ceux des témoins au cours de la même période.

▼ M1

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_t) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\% I_t = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

où:

- $\% I_t$: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen,
- μ_C : valeur moyenne de μ dans le groupe témoin,
- μ_T : valeur moyenne de μ dans le groupe traité.

2.2.2. Rendement

Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de deux variables mesurées: le nombre de thalles et une autre variable (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) mesurées dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai. En ce qui concerne le poids frais ou sec, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon de thalles prélevé dans le lot qui a servi à ensemençer les récipients d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.3). Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\% I_r = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

où:

- $\% I_r$: pourcentage de réduction du rendement,
- b_C : biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe témoin,
- b_T : biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe traité.

2.2.3. Tracé des courbes concentration-effet

On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (I_t ou I_r calculées comme indiqué au dernier alinéa des paragraphes 2.2.1 ou 2.2.2) en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai.

2.2.4. Estimation de la CE_x

Les estimations de la CE_x (par exemple, la CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et sur le rendement (C_xE_r), qui doivent, à leur tour, reposer sur le nombre de thalles et sur une variable mesurée supplémentaire (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) puisque certaines substances n'exercent pas le même effet sur le nombre de thalles que sur d'autres variables mesurées. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs de CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé: C_xE_t (nombre de thalles); C_xE_t (superficie totale des thalles, poids sec ou frais); C_xE_r (nombre de thalles); et C_xE_r (superficie totale des thalles, poids sec ou frais).

▼ **M1**

2.3. MÉTHODES STATISTIQUES

L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé — par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (16), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (16). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont destinées à être utilisées avec des effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (17)(18) et (19) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités.

Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec *bootstrap* (rééchantillonnage) (20), si les modèles ou méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les essais de Dunnett ou de William peuvent être utiles (21)(22)(23)(24). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance se confirme. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (25), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (19) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

Des découvertes récentes conduisent les scientifiques à préconiser l'abandon de la notion de CSEO au profit d'estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur appropriée de x n'a encore été établie pour cet essai sur les *Lemma*. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques, notamment la limite de solubilité dans l'eau,

▼ M1

- données d'identification chimique (par exemple, numéro CAS), y compris la pureté.

Espèce soumise à l'essai:

- nom scientifique, clone (s'il est connu) et source.

Conditions expérimentales:

- procédé expérimental appliqué (statique, semi-statique ou dynamique),
- date du début de l'essai et durée de l'essai,
- milieu expérimental,
- description de la conception de l'essai (récipients d'essai et couvercles, volumes des solutions, nombre de colonies et de thalles par récipient au début de l'essai),
- concentrations expérimentales (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre d'expériences identiques par concentration,
- méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris l'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant, le cas échéant,
- température appliquée durant l'essai,
- source, intensité et homogénéité lumineuses,
- valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins,
- concentrations de la substance d'essai, méthode d'analyse et données permettant d'évaluer la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses),
- méthodes de détermination du nombre de thalles et des autres variables mesurées, par exemple le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles,
- tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai.

Résultats:

- données brutes: nombre de thalles et autres variables mesurées dans chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse,
- moyennes et écarts-types de chaque variable mesurée,
- courbes de croissance à chaque concentration (il est recommandé d'ajouter la transformation logarithmique de la variable mesurée, voir deuxième alinéa du paragraphe 2.2.1),
- temps de doublement/taux de croissance chez le témoin d'après le nombre de thalles,
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique à chaque concentration, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des expériences identiques,
- représentation graphique de la relation concentration-effet,
- estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple CE_{50} , CE_{20} , CE_{10} et intervalles de confiance associés; si elles ont été calculées, la CME0 et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer,

▼ **M1**

- si on a pratiqué une analyse de la variance, la puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative),
- toute stimulation de la croissance, le cas échéant, dans un groupe traité,
- tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai,
- analyse des résultats, y compris l'influence d'un éventuel écart par rapport à cette méthode d'essai.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- 1) OCDE LD 221 (2006) *Lemna* sp. Essais d'inhibition de la croissance.
- 2) L'utilisation des études sur les *lemna* pour les substances colorées est détaillée au point 13.5.3 du Manuel des décisions de l'UE daté de juillet 2006, disponible à l'adresse <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals>
- 3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, disponible à l'adresse
 - i. http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A
- 4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- 5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.
- 6) AFNOR — Association française de normalisation. (1996). XP T 90-337: détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.
- 7) Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois).
- 8) Environment Canada. (1999). Méthode d'essai biologique: essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pages.
- 9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- 10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRC plc — Environment Agency.
- 11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.
- 12) ISO DIS 20079. Qualité de l'eau — détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) — essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau.

▼ M1

- 13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- 14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353-359.
- 15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- 16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- 17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- 18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- 19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.
- 20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- 21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- 22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- 23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- 24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- 25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼ **M1***Appendice 1***Description de *Lemna* spp.**

La plante aquatique communément appelée «lentille d'eau», *Lemna* spp., appartient à la famille des *Lemnaceae* représentée par quatre genres répartis dans le monde. Leur taxonomie et leur aspect ont été décrits de façon complète (1)(2). *Lemna gibba* et *Lemna minor* sont des espèces représentatives des zones tempérées et sont couramment utilisées dans les essais de toxicité. Ces deux espèces se caractérisent par une tige discoïde (thalle) flottante ou submergée, et une racine très fine partant du centre de la face inférieure de chaque thalle. Les *Lemna* spp. produisent rarement des fleurs et se reproduisent par voie végétative en engendrant de nouveaux thalles (3). Comparativement aux sujets âgés, les jeunes plantes ont tendance à être plus pâles, à avoir des racines plus courtes et à comporter deux ou trois thalles de différentes tailles. De par leur petite taille, leur structure simple, leur reproduction asexuée et la brièveté du temps séparant deux générations, les plantes du genre *Lemna* se prêtent remarquablement bien aux essais en laboratoire (4)(5).

La sensibilité étant susceptible de varier d'une espèce à l'autre, seules les comparaisons de sensibilités intraspécifiques sont valables.

Exemples d'espèces de *Lemna* ayant servi à des essais: références bibliographiques des espèces

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pages.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.

Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼ **M1**

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sources d'espèces de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
 Department of Botany, University of Toronto
 Toronto, Ontario, CANADA, M5S 3 B2
 Tél. + 1-416-978-3641
 Fax + 1-416-978-5878
 courriel: jacreman@botany.utoronto.ca
<http://www.botany.utoronto.ca/utcc>

North Carolina State University
 Forestry Dept
 Duckweed Culture Collection
 Campus Box 8002
 Raleigh, NC 27695-8002
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE
 Tél. 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
 SE-106 91 Stockholm
 SUÈDE
 Tél: + 46 86747240
 Fax + 46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
 FG III 3.4
 Schichauweg 58
 12307 Berlin
 ALLEMAGNE
 courriel: lemna@uba.de
<http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm>

Bibliographie

- 1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.
- 2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
- 3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
- 4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.
- 5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼ M1*Appendice 2***Entretien d'une culture mère**

Les cultures mères peuvent être conservées à basse température (4-10 °C) durant de longues périodes sans qu'il soit nécessaire de les rétablir. Le milieu de croissance des *Lemna* peut être identique à celui utilisé pour les essais, mais d'autres milieux riches en nutriments conviennent également aux cultures mères.

Régulièrement, plusieurs jeunes plantes vert clair sont prélevées et transférées aseptiquement dans de nouveaux récipients de culture contenant un milieu frais. Aux basses températures proposées ici, les sous-cultures peuvent être lancées à des intervalles allant jusqu'à trois mois.

Il convient d'utiliser des récipients de culture en verre stériles et chimiquement propres (lavés à l'acide), et d'employer des techniques de manipulation aseptiques. Si la culture mère est contaminée, par des algues ou des champignons par exemple, on prendra les mesures nécessaires pour éliminer les organismes contaminants. S'agissant des algues et de la plupart des autres organismes contaminants, une stérilisation en surface peut suffire. Pour ce faire, on prélève un échantillon des plantes contaminées et on leur coupe les racines. On agite ensuite les plantes vigoureusement dans de l'eau propre, avant de les immerger dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (v/v) durant 30 secondes à 5 minutes. Après quoi, on rince les plantes à l'eau stérile et on les transfère en plusieurs lots dans des récipients de culture contenant du milieu de croissance frais. Ce traitement détruit beaucoup de thalles, surtout si les périodes d'exposition sont plus longues, mais certaines des plantes survivantes ne sont généralement plus contaminées. Celles-ci peuvent alors être utilisées pour ensemercer de nouvelles cultures.

▼ **M1**

Appendice 3

Milieux

Différents milieux de croissance sont recommandés pour *L. minor* et *L. gibba*, à savoir une version modifiée du milieu établi par l'Institut suédois de normalisation (SIS) pour *L. minor*, et le milieu 20X AAP pour *L. gibba*. Ces deux milieux, dont les compositions sont données ci-dessous, doivent être préparés avec des réactifs et des produits de qualité «réactifs» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

Milieu de croissance pour Lemna établi d'après celui de l'Institut suédois de normalisation

- Les solutions mères I-V sont stérilisées à l'autoclave (120 °C, 15 minutes) ou par filtration sur une membrane (à pores d'environ 0,2 µm).
- La solution mère VI (et, si on le souhaite, la solution mère VII) ne sont stérilisées que par filtration sur membrane; elles ne doivent pas être autoclavées.
- Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Les solutions mères I-V doivent être éliminées après six mois, tandis que la solution mère VI et, le cas échéant, la solution mère VII, sont périmées après 1 mois.

| Solution mère n° | Substance | Concentration dans la solution mère (g/l) | Concentration dans le milieu préparé (mg/l) | Milieu préparé | |
|------------------|---|---|---|----------------|----------------------|
| | | | | Élément | Concentration (mg/l) |
| I | NaNO ₃ | 8,50 | 85 | Na; N | 32; 14 |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,34 | 13,4 | K; P | 6,0; 2,4 |
| II | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 15 | 75 | Mg; S | 7,4; 9,8 |
| III | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 7,2 | 36 | Ca; Cl | 9,8; 17,5 |
| IV | Na ₂ CO ₃ | 4,0 | 20 | C | 2,3 |
| V | H ₃ BO ₃ | 1,0 | 1,00 | B | 0,17 |
| | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0,20 | 0,20 | Mn | 0,056 |
| | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0,010 | 0,010 | Mo | 0,0040 |
| | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0,050 | 0,050 | Zn | 0,011 |
| | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,0050 | 0,0050 | Cu | 0,0013 |
| | Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 0,010 | 0,010 | Co | 0,0020 |
| VI | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 0,17 | 0,84 | Fe | 0,17 |
| | Na ₂ -EDTA·2H ₂ O | 0,28 | 1,4 | — | — |
| VII | MOPS (tampon) | 490 | 490 | — | — |

- Pour préparer un litre de milieu SIS, ajouter les ingrédients suivants à 900 ml d'eau désionisée:
 - 10 ml de solution mère I,
 - 5 ml de solution mère II,
 - 5 ml de solution mère III,
 - 5 ml de solution mère IV,

▼ **M1**

- 1 ml de solution mère V,
- 5 ml de solution mère VI,
- 1 ml de solution mère VII (facultatif).

Note: la solution mère VII (tampon MOPS) peut être nécessaire pour certaines substances d'essai (voir dernier alinéa du paragraphe 1.4).

- Le pH est ajusté à $6,5 \pm 0,2$ avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée.

Milieu de croissance 20X AAP

Les solutions mères sont préparées dans de l'eau stérile distillée ou désionisée.

Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Dans ces conditions, les solutions mères se conservent au moins 6 à 8 semaines.

Cinq solutions mères nutritives (A1, A2, A3, B et C) sont préparées pour le milieu 20X AAP, avec des produits de qualité «réactifs». Le milieu de croissance se compose de 20 ml de chaque solution mère nutritive ajoutés à environ 850 ml d'eau désionisée. Le pH est ajusté à $7,5 \pm 0,1$ avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée. Le milieu est ensuite filtré sur une membrane à pores d'environ $0,2 \mu\text{m}$ dans un récipient stérile.

Le milieu de croissance destiné aux essais doit être préparé un à deux jours avant son utilisation pour que le pH ait le temps de se stabiliser. On vérifie le pH du milieu de croissance avant utilisation et on le rajuste si nécessaire par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH 0,1 ou 1 M, comme décrit ci-dessus.

| Solution mère n° | Substance | Concentration dans la solution mère (g/ l) (1) | Concentration dans le milieu préparé (mg/l) (*) | Milieu préparé | |
|---------------------|---|--|---|----------------|-----------------------------|
| | | | | Élément | Concentration (mg/l) (*) |
| A1 | NaNO ₃ | 26 | 510 | Na; N | 190; 84 |
| | MgCl ₂ ·6H ₂ O | 12 | 240 | Mg | 58,08 |
| | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 4,4 | 90 | Ca | 24,04 |
| A2 | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 15 | 290 | S | 38,22 |
| A3 | K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 1,4 | 30 | K; P | 9,4; 3,7 |
| B | H ₃ BO ₃ | 0,19 | 3,7 | B | 0,65 |
| | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,42 | 8,3 | Mn | 2,3 |
| | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,16 | 3,2 | Fe | 0,66 |
| | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 0,30 | 6,0 | — | — |
| | ZnCl ₂ | 3,3 mg·l ⁻¹ | 66 µg·l ⁻¹ | Zn | 31 µg·l ⁻¹ |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 1,4 mg·l ⁻¹ | 29 µg·l ⁻¹ | Co | 7,1 µg·l ⁻¹ |
| | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 7,3 mg·l ⁻¹ | 145 µg·l ⁻¹ | Mo | 58 µg·l ⁻¹ |
| | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0,012 mg·l ⁻¹ | 0,24 µg·l ⁻¹ | Cu | 0,080 µg·l ⁻¹ |
| C | NaHCO ₃ | 15 | 300 | Na; C | 220; 43 |

(*) Sauf mention contraire.

▼ **M1**

Note: la concentration finale de bicarbonate théoriquement appropriée (permettant d'éviter un ajustement appréciable du pH) est de 15 mg/l et non de 300 mg/l. Toutefois, le milieu 20X-AAP a jusqu'à présent été utilisé avec une concentration de 300 mg/l de bicarbonate, y compris dans l'essai tournant réalisé pour cette méthode [I. Sims, P. Whitehouse et R. Lacey (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency].

Milieu de Steinberg (d'après la norme ISO 20079)*Concentrations et solutions mères*

— Dans la norme ISO 20079, le milieu modifié de Steinberg n'est utilisé que pour *Lemna minor* (puisque seule *Lemna minor* est autorisée dans les essais relevant de cette norme), mais des essais ont montré que *Lemna gibba* pouvait également donner de bons résultats.

— Ce milieu doit être préparé avec des produits de qualité «réactifs» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

— Préparer le milieu nutritif à partir de solutions mères ou du milieu dix fois plus concentré (permettant d'atteindre une concentration maximale sans précipitation).

Tableau 1

Milieu de Steinberg À pH stabilisé (modifié par Altenburger)

| Substance | | Milieu nutritif | |
|---|---------------|-----------------|--------|
| Macroéléments | poids molaire | mg/l | mmol/l |
| KNO ₃ | 101,12 | 350,00 | 3,46 |
| Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 236,15 | 295,00 | 1,25 |
| KH ₂ PO ₄ | 136,09 | 90,00 | 0,66 |
| K ₂ HPO ₄ | 174,18 | 12,60 | 0,072 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 246,37 | 100,00 | 0,41 |
| Microéléments | poids molaire | µg/l | µmol/l |
| H ₃ BO ₃ | 61,83 | 120,00 | 1,94 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 287,43 | 180,00 | 0,63 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 241,92 | 44,00 | 0,18 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 197,84 | 180,00 | 0,91 |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 270,21 | 760,00 | 2,81 |
| EDTA dihydrate de sodium | 372,24 | 1 500,00 | 4,03 |

▼ **M1**

Tableau 2

Solutions mères (macroéléments)

| 1. Macroéléments (concentrés cinquante fois) | g/l |
|---|-------|
| <i>Solution mère 1:</i> | |
| KNO ₃ | 17,50 |
| KH ₂ PO ₄ | 4,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,63 |
| <i>Solution mère 2:</i> | |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 5,00 |
| <i>Solution mère 3:</i> | |
| Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 14,75 |

Tableau 3

Solutions mères (microéléments)

| 2. Microéléments (concentrés mille fois) | mg/l |
|--|----------|
| <i>Solution mère 4:</i> | |
| H ₃ BO ₃ | 120,0 |
| <i>Solution mère 5:</i> | |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 180,0 |
| <i>Solution mère 6:</i> | |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 44,0 |
| <i>Solution mère 7:</i> | |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 180,0 |
| <i>Solution mère 8:</i> | |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 760,00 |
| EDTA dihydrate de sodium | 1 500,00 |

— Les solutions mères 2 et 3 peuvent être réunies, de même que les solutions mères 4 et 7 (en tenant compte des concentrations requises).

— Pour augmenter la durée de conservation des solutions mères, stériliser celles-ci en les laissant 20 minutes dans l'autoclave à 121 °C ou en les filtrant de manière stérile sur une membrane à pores de 0,2 µm. La stérilisation par filtration (0,2 µm) est fortement recommandée pour la solution mère 8.

Préparation du milieu de Steinberg (modifié) à la concentration finale

— Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 900 ml d'eau désionisée afin d'éviter une précipitation.

— Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3).

— Le pH doit être à 5,5 ± 0,2 (ajuster par ajout d'un volume minime de solution de NaOH ou de HCl).

▼ M1

- Porter à 1 000 ml avec de l'eau.
- Si les solutions mères sont stérilisées et que l'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).

Préparation du milieu de Steinberg (modifié) concentré dix fois pour stockage intermédiaire

- Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 30 ml d'eau afin d'éviter une précipitation.
- Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3). Porter à 100 ml avec de l'eau.
- Si les solutions mères sont stérilisées et que l'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).
- Le pH du milieu (concentration finale) doit être à $5,5 \pm 0,2$.

▼ **M4****C.27 ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT DOPÉ**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 218 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe (1) (2) (3) et en Amérique du Nord (4) (5) (6) (7) (8), et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Le scénario d'exposition appliqué dans cette méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans le sédiment. La sélection du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le dopage du sédiment vise à simuler l'accumulation de produits chimiques persistants dans le sédiment. Ce chargement s'effectue dans un système expérimental eau-sédiment.
3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.
4. Les effets observés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.
5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:
 - la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,
 - les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,
 - les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.
6. L'appendice 1 contient les définitions employées dans la présente méthode d'essai.

▼ **M4**

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. Une fois la substance d'essai incorporée au sédiment, des larves au premier stade sont introduites dans des béciers où les concentrations d'eau et de sédiment ont été stabilisées. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE₁₅, CE₅₀, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière nécessite une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, dans l'eau des pores et dans le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple sa dissipation, sa dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement afin de démontrer la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

- l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),

- s'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,

- à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,

- la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de $\pm 1,0$ °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

▼ **M4**

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification de l'espèce est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique, (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée) et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8, est recommandé (14) (1) (15) (16):

- a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;
- b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);
- c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);
- d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;
- e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à $7,0 \pm 0,5$. Il convient d'obtenir 2 % ($\pm 0,5$ %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).

14. Les sources de tourbe, de kaolin et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, des composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

▼ M4**Eau**

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 peut servir à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en CaCO₃. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu ElenDt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – sédiments dopés

16. Les sédiments dopés sont généralement préparés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance d'essai au sédiment. Une solution mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un agitateur à rouleaux, d'un mélangeur pour aliments ou mélangée à la main. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi petit que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient d'essai. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à ce qu'il soit totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment par béccher. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de la substance d'essai et du sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et mener un essai limite est décrite.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE₁₅, CE₅₀) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet produit par la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire pour déterminer la gamme des concentrations à utiliser (voir paragraphe 27).

▼ M4

19. S'il faut estimer la CE_x , au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite se pratique avec une concentration suffisamment élevée pour permettre aux décideurs d'exclure tout effet toxique possible de la substance d'essai et la limite est fixée à une concentration censée ne jamais être atteinte dans les conditions réelles. Une concentration de 1 000 mg/kg (poids sec) est recommandée. Il est généralement nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour détecter une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher convient.

MODE OPÉRATOIRE**Conditions d'exposition***Préparation du système sédiment dopé – eau*

22. La procédure de mélange de la substance d'essai au sédiment décrite dans la méthode d'essai C.8, Toxicité pour les vers de terre, est recommandée pour cet essai (14). Les sédiments dopés sont placés au fond des récipients avant d'y verser l'eau, de façon à obtenir un ratio volumique sédiment-eau de 1/4 (voir paragraphes 11 et 15). La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm. Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines pendant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs conviennent également.
23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

▼ **M4***Stabilisation*

24. Une fois que le sédiment dopé surmonté d'une couche d'eau a été préparé, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (3) (4) (6) (13), et ce, de préférence, dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. L'équilibre met de quelques heures à quelques jours à s'établir, voire 4-5 semaines dans de rares cas, selon le sédiment et la substance chimique. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint, car beaucoup de substances risquent de se dégrader durant cette période, mais un temps d'attente de 48 heures est recommandé. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, les pores et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et la plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.

Introduction des organismes d'essai

25. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des mouches d'après la largeur de la capsule céphalique (6).
26. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment dopé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.
28. Les concentrations pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme décrit aux paragraphes 18 à 20.

▼ **M4***Témoins*

29. L'essai inclura le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement TetraPhyll; ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement moulue, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être ajoutée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), par exemple, ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.
33. L'essai est mené à température constante (20 °C ± 2 °C). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'éclairage compris entre 500 et 1 000 lux.

▼ M4*Durée de l'exposition*

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale de l'exposition s'élève à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et à 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

Observations*Émergence*

35. La durée du développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.
36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, on comptera le nombre de moucheron émergés et on consignera le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Après identification, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients d'essai supplémentaires seront ajoutés dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires sera tamisé à travers des mailles de 250 µm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques*Concentration de la substance d'essai*

38. Avant le début de l'essai (c'est-à-dire avant l'introduction des larves), on prélève des échantillons du sédiment d'au moins un récipient par traitement, afin de déterminer analytiquement la concentration de la substance d'essai dans le sédiment. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau des pores, et du sédiment, au début (voir paragraphe 24) et à la fin de l'essai, et ce de la concentration la plus élevée et d'une concentration plus basse. Les concentrations de la substance d'essai nous renseignent sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment.
39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour des observations biologiques.

▼ **M4**

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau des pores soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH de l'eau et la température des récipients d'essai doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau) $\chi^2 - r \times 2$, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.
43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en fonction du poids sec, à partir des concentrations mesurées dans le sédiment au début de l'essai (voir paragraphe 38).
44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x , les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x , il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été «retransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.
45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).

▼ **M4**

La somme des mouchérons émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de mouchérons émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient

47. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de William si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de mouchérons émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.
48. Pour réaliser l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation «arcsinus-racine carrée» ou «Freeman-Tukey» afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus (\sin^{-1}) de la racine carrée du TE .
49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

50. La période de développement moyenne représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de mouchérons (pour calculer la période de développement réelle, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement, car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).
51. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de mouchérons observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x - 1$ (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (\bar{x}) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

▼ M4

où:

\bar{x} : vitesse de développement moyenne par récipient

i: indice de l'intervalle d'observation

m: nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i : nombre de moucheron émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e : nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience ($=\sum f_i$)

x_i : vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{jour}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

où:

jour_i : jour d'observation (compté depuis l'application)

1_i : durée de l'intervalle d'observation I (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

- animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,
- informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

Conditions expérimentales:

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,
- pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,
- préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau des pores; poids du sédiment humide avec et sans eau des pores,

▼ **M4**

- récipients expérimentaux (matériau et dimension),
- méthode de chargement du sédiment: concentrations expérimentales appliquées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,
- phase de stabilisation du système sédiment dopé-eau: durée et conditions,
- conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),
- informations détaillées sur la nourriture: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,
- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour,
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient,
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,
- pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- vitesse de développement moyenne des moucheron totalement émergés par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEO, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼ **M4**

- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., and Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Méthode d'essai C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (15) Suedel B.C. and J.H. Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and C. Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.
- (19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
- (20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼ M4*Appendice 1*

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

Le **sédiment dopé** est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ **M4***Appendice 2***Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius***

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).
2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont installées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (TetraMin®, TetraPhyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.
5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.
6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

▼ M4**Émergence**

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.
10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucheron adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $\text{NaSiO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour préparer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H. Köpp. Berlin 1995.

▼ **M4**

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

| Solutions mères (I) | Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée | Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à 1 litre avec de l'eau désionisée | | Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l) | |
|---|---|--|------|---|---------|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| H ₃ BO ₃ (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| MnCl ₂ · 4 H ₂ O (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| SrCl ₂ · 6 H ₂ O (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| CuCl ₂ · 2 H ₂ O (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| ZnCl ₂ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| CaCl ₂ · 6 H ₂ O | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| Na ₂ SeO ₃ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| NH ₄ VO ₃ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Ces substances sont dosées différemment en M4 et M7, comme indiqué plus haut.

(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

| | Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée | Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l) | Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l) |
|---|---|--|--|
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| NaHCO ₃ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| NaSiO ₃ · 9 H ₂ O | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| NaNO ₃ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼ **M4**

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7. Les trois solutions de vitamines seront mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

| | Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg) | Quantité de solution mère de vitamines ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l) | Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l) |
|---------------------------|---|---|--|
| Hydrochlorure de thiamine | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyanocobalamine (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotine | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

BIBLIOGRAPHIE:

Elenkt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elenkt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***Appendice 3*

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

| Ingrédient | Caractéristiques | % du sédiment poids sec |
|----------------------|---|----------------------------|
| Tourbe | Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air | 4 - 5 |
| Sable quartzique | Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μ m | 75 - 76 |
| Argile kaolinique | Taux de kaolinite ≥ 30 % | 20 |
| Carbone organique | Ajusté par l'addition de tourbe et de sable | 2 ($\pm 0,5$) |
| Carbonate de calcium | CaCO ₃ , pulvérisé, chimiquement pur | 0,05 - 0,1 |
| Eau | Conductivité ≤ 10 μ S/cm | 30 - 50 |

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO₃. La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre $6,0 \pm 0,5$. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du CaCO₃, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial MEDIA. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

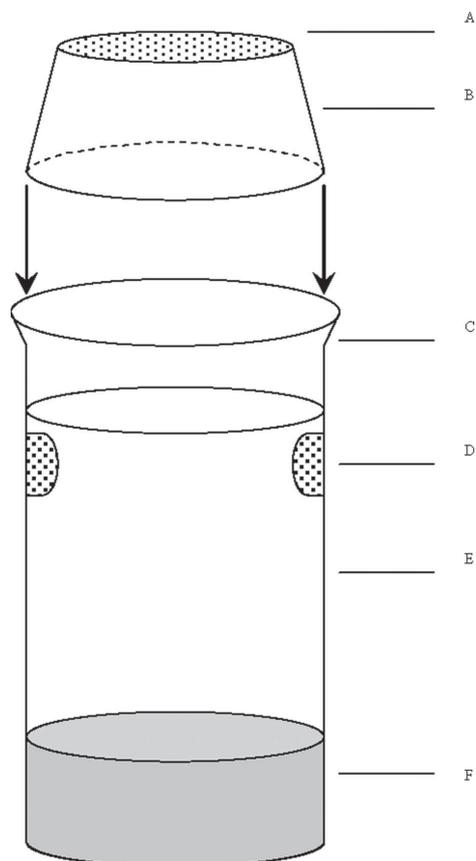
▼ **M4***Appendice 4***Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable**

| Substance | Concentrations |
|---|----------------|
| Matières particulaires | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Dureté en CaCO ₃ | < 400 mg/l (*) |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Totalité des pesticides organophosphorés | < 50 ng/l |
| Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |

(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼ **M4***Appendice 5***Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes**

Les béchers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20^e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: béccher expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges.

E: eau.

F: sédiment.

▼M4

C. 28. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 219 de l'OCDE (2004) pour les essais de produits chimiques. Elle est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice du BBA, dans laquelle l'exposition s'effectue à l'aide d'un système expérimental sédiment-eau, composé de sol artificiel et d'une colonne d'eau (1). Elle tient compte également des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe et en Amérique du Nord (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Le scénario d'exposition appliqué dans la présente méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans l'eau. La sélection du scénario d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le scénario d'exposition qui consiste à doper la colonne d'eau, vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentrations initial dans l'eau interstitielle. Il s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment des fuites de produits chimiques), à l'exclusion des processus d'accumulation d'une durée supérieure à celle de l'essai.
3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets de substances chimiques instables, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.
4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.
5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:
 - la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,
 - les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,

▼ **M4**

- les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence; les essais pratiqués sur des sédiments naturels et artificiels ont fourni des données de toxicité comparables pour plusieurs substances chimiques (2).
6. L'appendice 1 contient les définitions applicables à la présente méthode d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves au premier stade dans les béciers expérimentaux contenant le système sédiment-eau et l'ajout de la substance d'essai à l'eau. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE₁₅, CE₅₀, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière requiert une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement pour démontrer la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:
- l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),
 - s'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,
 - à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,

▼ **M4**

- la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de $\pm 1,0$ °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Récipients expérimentaux**

11. L'essai se déroule dans des béciers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8 est recommandé (14) (1) (15) (16):

- a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;
- b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);
- c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μ m);
- d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;
- e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO₃) pour ajuster le pH du mélange final de sédiments à $7,0 \pm 0,5$;
- f) il convient d'obtenir 2 % ($\pm 0,5$ %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).

▼ M4

14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flotement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en CaCO₃. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – eau chargée

16. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau recouvrant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution mère. Il est préférable de préparer les solutions mères en dissolvant la substance d'essai dans le milieu d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Voici quelques exemples de solvants appropriés: acétone, éthanol, méthanol, éthylèneglycol, monoéthyléther, diméthyléther d'éthylèneglycol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Les dispersants qui peuvent être utilisés sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et l'HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale ($\leq 0,1$ ml/l) et identique dans tous les traitements. L'agent solubilisant, s'il est utilisé, ne doit pas avoir d'effets significatifs sur la survie, ni d'effet nocif visible sur les larves de chironomes, et ce d'après l'observation des organismes du récipient témoin traité uniquement au solvant. Néanmoins, l'utilisation de ces substances est à éviter dans la mesure du possible.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et effectuer un essai limite est décrite. L'analyse de régression est préférable à une approche par vérification d'hypothèses.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE₁₅, CE₅₀) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet de la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler

▼ **M4**

des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur afin de délimiter la gamme des concentrations à appliquer (voir paragraphe 27).

19. S'il faut estimer la CE_{x_3} , au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être testées. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite vise à montrer que la concentration toxique de la substance d'essai est supérieure à la concentration limite testée. Aucune concentration ne peut être recommandée pour cette méthode d'essai; cela est laissé à l'appréciation des instances réglementaires. Généralement, il est nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour révéler une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système eau chargée-sédiment

22. Une quantité appropriée de sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et appendice 3) est déposée dans les récipients expérimentaux, de façon à former une couche d'au moins 1,5 cm. La profondeur de l'eau versée sur ce sédiment atteindra 6 cm (voir paragraphe 15). Le ratio entre la profondeur du sédiment et la profondeur de l'eau n'excédera pas 1/4 et la couche de sédiment ne dépassera pas 3 cm. Le système sédiment-eau sera laissé sous aération légère pendant 7 jours avant l'ajout des organismes d'essai (voir paragraphe 14 et appendice 3). Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines durant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique et retirer le disque juste après le remplissage. D'autres dispositifs conviennent également.

▼ **M4**

23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Introduction des organismes d'essai

24. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucheron d'après la largeur de la capsule céphalique (6).
25. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 24 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.
26. Vingt-quatre heures après l'introduction des larves dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente et une légère aération est à nouveau dispensée. De petits volumes de la solution contenant la substance d'essai sont injectés en dessous de la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, il convient de mélanger l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.
28. Les concentrations expérimentales pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme indiqué aux paragraphes 18 à 20.

Témoins

29. L'essai comportera le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

▼ **M4***Système expérimental*

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement broyée, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en œuvre de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.
33. L'essai est mené à température constante (20 °C ± 2 °C). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'éclairage compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale d'exposition atteint 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

OBSERVATIONS

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.

▼ **M4**

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients d'essai ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, il faut compter le nombre de moucheron émergés et consigner le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Une fois identifiés, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront inclus dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires est tamisé à travers des mailles de 250 µm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques*Concentration de la substance d'essai*

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle, et du sédiment, au début (de préférence une heure après l'application de la substance d'essai) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Le prélèvement d'échantillons de sédiment au début de l'essai risque de perturber le système d'essai (enlèvement de larves, par exemple), il faut donc inclure des récipients expérimentaux supplémentaires pour effectuer des déterminations analytiques au début de l'essai et, s'il y a lieu, au cours de l'essai (voir paragraphe 39). Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment si la répartition de la substance d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, quotient sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment).
39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour les observations biologiques.
40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger des échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

▼ **M4***Paramètres physico-chimiques*

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température des récipients expérimentaux doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT*Traitement des résultats*

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être appréciées statistiquement par un test (de tableau) à $\chi^2 - r \times 2$, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.
43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus-jacente, en fonction des concentrations mesurées au début de l'essai (voir paragraphe 38).
44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x , les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x , il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été «retransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.
45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'hypothèses, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).
47. La somme des moucheron émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

▼ **M4**

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucheron émergés par récipient

n_e = nombre de larves introduites par récipient

48. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de Williams, si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les résultats du taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucheron émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient d'essai.
49. Pour appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation «arcsinus-racine carrée» ou «Freeman-Tukey» afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus (\sin^{-1}) de la racine carrée du TE .
50. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

51. La période moyenne de développement représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucheron (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).
52. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucheron observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x - 1$ (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (\bar{x}) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

où:

\bar{x} : vitesse de développement moyenne par récipient

i : indice de l'intervalle d'observation

m : nombre maximal d'intervalles d'observation

▼ M4

f_i : nombre de mouchérons émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e : nombre total de mouchérons émergés à la fin de l'expérience ($=\sum f_i$)

x_i : vitesse de développement des mouchérons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1 / \left(\text{jour}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

où:

jour_i : jour d'observation (compté à partir de l'application)

l_i : durée de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

- animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,
- informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients d'essai.

Conditions expérimentales:

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,
- pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,
- préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau interstitielle; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle,
- récipients expérimentaux (matériau et dimension),
- méthode de préparation des solutions mères et des concentrations expérimentales,

▼ **M4**

- application de la substance d'essai: concentrations expérimentales utilisées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,
- conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),
- informations détaillées sur la nourriture: type de nourriture, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,
- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour,
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient,
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,
- pourcentage d'émergence par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- vitesse de développement moyenne des moucheron totalement émergés par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEQ, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environnement Canada (1997). Essai de croissance et de survie de larves de moucheron d'eau douce (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*). Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Décembre 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼ **M4**

- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OCDE Publications Hygiène et sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.
- (13) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30. Septembre 1995.
- (14) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.
- (19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.
- (20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼ M4*Appendice 1*

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau recouvrant le sédiment dans le récipient d'essai.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

L'**eau chargée** est l'eau d'essai à laquelle on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ **M4***Appendice 2***Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius***

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).
2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % pourrait empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.
5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.
6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergeant

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucre saturée.

▼ **M4****Émergence**

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs sont utilisés pour préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou pratiquer des essais de toxicité.
10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucheron adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). 50 ml de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 l avec de l'eau désionisée pour composer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

| Solutions mères (I) | Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée | Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée | | Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l) | |
|--|--|---|------|---|-------|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| H_3BO_3 (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |

▼ **M4**

| Solutions mères (I) | Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée | Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée | | Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l) | |
|--|--|---|------|---|---------|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| RbCl ⁽¹⁾ | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| SrCl ₂ • 6 H ₂ O ⁽¹⁾ | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr ⁽¹⁾ | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O ⁽¹⁾ | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| CuCl ₂ • 2 H ₂ O ⁽¹⁾ | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| ZnCl ₂ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| CaCl ₂ • 6 H ₂ O | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| Na ₂ SeO ₃ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| NH ₄ VO ₃ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O ^{(1) (2)} | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| FeSO ₄ • 7 H ₂ O ^{(1) (2)} | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

⁽¹⁾ Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.

⁽²⁾ Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

| | Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg) | Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l) | Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l) |
|---|--|--|--|
| CaCl ₂ • 2 H ₂ O | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| MgSO ₄ • 7 H ₂ O | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| NaHCO ₃ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| NaSiO ₃ • 9 H ₂ O | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| NaNO ₃ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼ **M4**

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines.

| | Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg) | Quantités de solutions mères de vitamines ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l) | Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l) |
|---------------------------|---|---|--|
| Hydrochlorure de thiamine | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyanocobalamine (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotine | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***Appendice 3*

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

| Ingrédient | Caractéristiques | % du sédiment poids sec |
|----------------------|---|-------------------------|
| Tourbe | Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air | 4-5 |
| Sable quartzique | Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μm | 75-76 |
| Argile kaolinique | Taux de kaolinite ≥ 30 % | 20 |
| Carbone organique | Ajusté par l'addition de tourbe et de sable | 2 ($\pm 0,5$) |
| Carbonate de calcium | CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur | 0,05 - 0,1 |
| Eau | Conductivité ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$ | 30 - 50 |

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO_3 . La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre $6,0 \pm 0,5$. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du CaCO_3 , si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial MEDIA. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

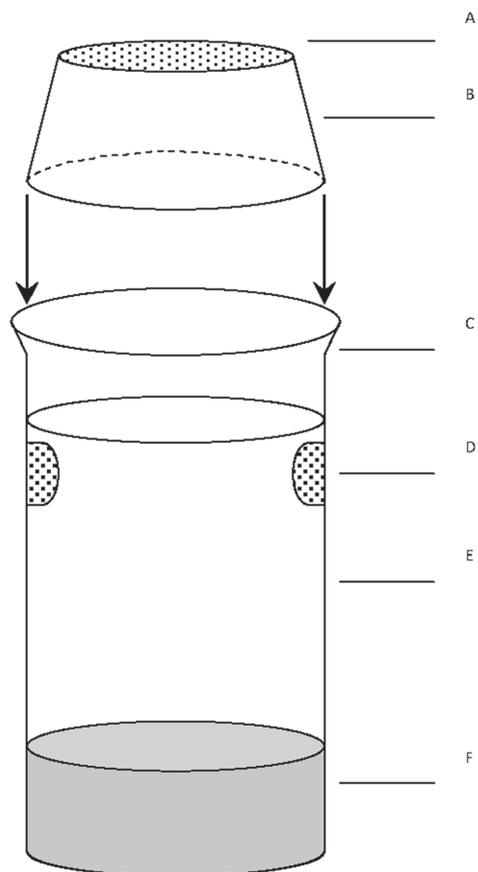
▼ **M4***Appendice 4***Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable**

| Substance | Concentrations |
|---|----------------|
| Matières particulaires | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Dureté en CaCO ₃ | < 400 mg/l (*) |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Totalité des pesticides organophosphorés | < 50 ng/l |
| Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |

(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼ **M4***Appendice 5***Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes**

Les béchers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20^e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécher expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges d'eau.

E: eau.

F: sédiment.

▼ **M4****C.29. BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO₂ DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 310 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode de criblage permet de classer les substances chimiques en fonction de leur biodégradabilité facile et fournit des informations semblables à celles exposées dans les six méthodes d'essai (A à F) décrites au chapitre C.4 de la présente annexe. Par conséquent, une substance chimique livrant un résultat positif pour cet essai de l'espace de tête peut être considérée comme facilement biodégradable et donc rapidement dégradable dans l'environnement.
2. L'essai, désormais bien mis au point, de dégagement de CO₂ (1), basé sur l'essai original de Sturm (2), qui permet d'évaluer la biodégradabilité des produits chimiques organiques d'après la mesure du dioxyde de carbone produit par l'activité microbiologique, est normalement celui qui se prête le mieux à l'essai des substances chimiques peu solubles et celles fortement adsorbantes. Il est également choisi pour les substances solubles (mais non volatiles) puisque beaucoup considèrent que le dégagement de dioxyde de carbone constitue la seule preuve irréfutable de l'activité microbiologique. La disparition du carbone organique dissous peut faire intervenir des processus physico-chimiques (adsorption, volatilisation, précipitation, hydrolyse) ainsi que l'action microbiologique et de nombreuses réactions non-biologiques consommant de l'oxygène; il est rare que le CO₂ soit produit à partir de produits chimiques organiques par un processus abiotique. Dans les essais original et modifié de Sturm (1) (2), le CO₂ est extrait de la phase liquide et envoyé dans des récipients absorbants par barbotage (passage bulle à bulle d'air traité à travers le milieu liquide pour éliminer le CO₂), alors que dans la version de Larson (3) (4), lors de son transfert du réacteur vers l'absorbeur, le CO₂ traverse un espace de tête contenant de l'air exempt de CO₂, tandis que le réacteur est agité en continu. Le réacteur n'est agité que dans la version de Larson modifiée; l'agitation n'est prescrite que pour les substances insolubles dans la norme ISO 9439 (5) et dans la version originale des États-Unis (6), qui prescrivent toutes deux le barbotage plutôt que le remplacement de l'espace de tête. Dans une autre méthode officielle (7) de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), basée sur la méthode de Gledhill (8), le réacteur agité est fermé à l'atmosphère et le CO₂ produit est directement recueilli de la phase gazeuse dans un piège alcalin interne, comme dans les respiromètres classiques de Warburg/Barcroft.
3. Il a toutefois été démontré que le carbone inorganique s'accumule dans le milieu durant l'application de l'essai standard modifié de Sturm à plusieurs substances chimiques (9). La dégradation de l'aniline à 20 mg C/l a produit une concentration assez élevée de carbone inorganique, à savoir 8 mg/l. Autrement dit, la collecte de CO₂ dans les pièges alcalins n'a pas reflété la quantité réelle de CO₂ produite par des processus microbiologiques à des moments intermédiaires au cours de la dégradation. Par conséquent, la prescription selon laquelle une production de CO₂ supérieure à 60 % de la production maximale théorique (ThCO₂) doit être atteinte dans un intervalle de 10 jours (les dix jours suivant immédiatement le franchissement du seuil de 10 % de biodégradation) pour une substance d'essai à classer comme facilement biodégradable, ne pourra être respectée pour certaines substances qui rentreraient dans cette classification d'après la disparition du carbone organique dissous.
4. Lorsque le pourcentage de dégradation est inférieur au niveau attendu, il est probable que du carbone inorganique se soit accumulé dans la solution expérimentale. À ce moment-là, la dégradabilité peut être évaluée avec les autres essais de biodégradabilité facile.

▼ **M4**

5. D'autres inconvénients de la méthode de Sturm (laborieuse, longue, davantage sujette à des erreurs expérimentales et non applicable aux substances volatiles) avaient déjà incité les chercheurs à s'orienter vers une technique en flacon hermétiquement clos, autre que celle de Gledhill, plutôt que d'utiliser un écoulement gazeux continu (10) (11). Boatman *et al.* (12) ont réexaminé les méthodes précédentes et adopté un système d'espace de tête fermé dans lequel le CO₂ est libéré dans l'espace de tête à la fin de l'incubation moyennant une acidification du milieu. Le CO₂ était mesuré par chromatographie gazeuse (carbone inorganique) dans des échantillons prélevés automatiquement de l'espace de tête, mais le carbone inorganique dissous dans la phase liquide n'était pas pris en compte. En outre, les récipients utilisés étaient très petits (20 ml) et ne contenaient que 10 ml de milieu, ce qui engendrait des problèmes, par exemple lorsqu'on ajoutait des quantités forcément très petites de substances d'essai insolubles, et/ou du fait que le milieu inoculé risquait de ne pas renfermer (suffisamment) de micro-organismes capables de dégrader les substances d'essai.
6. Ces problèmes ont été résolus par les études indépendantes de Struijs et Stoltenkamp (13) et de Birch et Fletcher (14), ces derniers s'étant inspirés de leur expérience avec les appareils utilisés dans l'essai de biodégradation anaérobie (15). Dans la première méthode (13), le CO₂ est mesuré dans l'espace de tête après acidification et équilibrage, tandis que dans la seconde (14), le carbone inorganique dissous est mesuré dans les phases gazeuse et liquide, sans traitement; plus de 90 % du carbone inorganique formé était présent dans la phase liquide. Ces deux méthodes présentent des avantages sur l'essai de Sturm du fait que le système expérimental est plus compact et maniable, qu'elles s'appliquent aussi aux substances volatiles et que le risque de retard dans la mesure du CO₂ produit est écarté.
7. Ces deux approches ont été combinées dans la norme ISO (essai au CO₂ – espace de tête) (16) qui a fait l'objet d'un essai circulaire (17) et qui forme la base de la présente méthode d'essai. Ces deux approches ont également été appliquées dans la méthode de l'US EPA (18). Deux méthodes de mesure du CO₂ ont été recommandées, à savoir le CO₂ dans l'espace de tête après acidification (13) et le carbone inorganique dans la phase liquide après l'ajout d'un excès de base. Cette dernière méthode a été introduite par Peterson au cours de l'essai circulaire, conduit par le CONCAWE (19), de cette méthode de l'espace de tête modifiée pour mesurer la biodégradabilité intrinsèque. Les changements apportés par la révision effectuée en 1992 (20) des méthodes contenues dans le chapitre C.4 de la présente annexe pour les essais de biodégradabilité facile ont été incorporés dans la présente méthode d'essai, si bien que les conditions (milieu, durée, etc.) sont par ailleurs identiques à celles de l'essai modifié de Sturm (20). Birch et Fletcher (14) ont montré que, sur les mêmes substances, l'essai de l'espace de tête livrait des résultats très proches de ceux de l'essai circulaire organisé par l'OCDE des méthodes d'essai révisées (21).

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Une population mixte de micro-organismes estensemencée dans un milieu tampon composé de sels minéraux, où la substance d'essai, généralement à une concentration de 20 mg C/l, représente la seule source de carbone et d'énergie. L'essai est conduit dans des flacons hermétiquement clos comportant un espace de tête d'air, qui sert de réserve d'oxygène pour la biodégradation aérobie. On détermine le CO₂ dégagé par la biodégradation aérobie finale de la substance d'essai en mesurant l'excédent de carbone inorganique produit dans les flacons d'essai par rapport au carbone inorganique produit dans les flacons témoins à blanc ne renfermant que le milieuensemencé. Le degré de biodégradation est exprimé en pourcentage de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI), d'après la quantité de substance d'essai (en carbone organique) ajoutée au départ.
9. La disparition de carbone organique dissous et/ou le niveau de la biodégradation primaire de la substance d'essai peuvent aussi être mesurés (20).

▼ **M4**

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

10. Il faut connaître la teneur (% poids) en carbone organique de la substance d'essai, d'après sa structure chimique ou par une mesure, de façon à pouvoir calculer le pourcentage de dégradation. Dans le cas des substances d'essai volatiles, il est utile de mesurer ou de calculer la constante de Henry afin de déterminer un rapport volumique espace de tête/liquide approprié. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes permettent de choisir une concentration d'essai appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible: on recommande d'inclure un témoin d'inhibition, sauf si l'on sait que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes (voir paragraphe 24).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

11. Cet essai convient aux substances insolubles et solubles dans l'eau, cependant la substance d'essai doit être bien dispersée. Si l'on applique le rapport volumique espace de tête/liquide recommandé de 1/2, les substances volatiles dont la constante de Henry ne dépasse pas $50 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ peuvent être testées puisque la proportion de la substance d'essai dans l'espace de tête n'excèdera pas 1 % (13). Un volume plus petit d'espace de tête peut être utilisé pour tester des substances plus volatiles, mais dont la biodisponibilité risque d'être limitante, surtout si elles sont peu solubles dans l'eau. Toutefois, les expérimentateurs doivent s'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide et la concentration de la substance d'essai laissent suffisamment d'oxygène disponible pour permettre à la biodégradation aérobie d'être complète (en évitant, par exemple, d'utiliser un substrat très concentré et un petit espace de tête). Des orientations sur ce point figurent dans les références (13) et (23).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

12. Il faut vérifier le procédé expérimental en testant en parallèle une substance de référence de biodégradabilité connue. À cet effet, l'aniline, le benzoate de sodium ou l'éthylèneglycol peuvent être utilisés pour les substances d'essai solubles dans l'eau et le 1-octanol pour les substances d'essai peu solubles (13). La biodégradation de ces substances doit être supérieure à 60 % de la ThCI au bout de 14 jours.

REPRODUCTIBILITÉ

13. L'essai circulaire réalisé par l'ISO de la méthode (17) a produit les résultats suivants, pour les conditions recommandées, notamment une concentration de la substance d'essai de 20 mg C/l:

| Substance d'essai | Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours) | Coefficient de variation (%) | Nombre de laboratoires |
|-------------------|--|------------------------------|------------------------|
| Aniline | 90 | 16 | 17 |
| 1-octanol | 85 | 12 | 14 |

Avec l'aniline, la variabilité interne de l'essai était faible, les coefficients de variabilité ne dépassant pas 5 % dans presque tous les essais. Dans les deux cas où la répétabilité a été moins bonne, la plus grande variabilité a probablement été due à une production élevée de carbone inorganique dans les témoins à blanc. Le 1-octanol a donné lieu à une moins bonne répétabilité, mais avec une variabilité néanmoins inférieure à 10 % dans 79 % des essais. Cette plus grande variabilité interne de l'essai pourrait résulter d'erreurs de dosage, le volume de 1-octanol à injecter dans les flacons expérimentaux hermétiquement clos étant faible (3 à 4 µl). Des concentrations plus faibles de la substance d'essai engendreraient des coefficients de variation plus élevés, en particulier aux concentrations inférieures à 10 mg C/l. Ce problème pourrait être en partie résolu par la diminution de la concentration du carbone inorganique total dans l'inoculum.

▼ **M4**

14. Un essai circulaire de cinq agents tensioactifs à 10 mg C/L, organisé par l'Union européenne (24), a livré les résultats suivants:

| Substance d'essai | Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours) | Coefficient de variation (%) | Nombre de laboratoires |
|---|--|------------------------------|------------------------|
| Benzènesulfonate de tétrapropylène | 17 | 45 | 10 |
| Diisooctylsulfosuccinate (anionique) | 72 | 22 | 9 |
| Chlorure d'ammonium hexadécyl-triméthylthyrique (*) (cationique) | 75 | 13 | 10 |
| (éthoxylate d') ₉ isononylphénol (non ionique) | 41 | 32 | 10 |
| Cocoamidepropyl-diméthylhydroxy-sulfobetaine (amphotère) | 60 | 23 | 11 |

(*) Le SiO₂ a été ajouté pour neutraliser la toxicité.

Les résultats montrent qu'en général, les agents tensioactifs les moins bien dégradés présentent une plus grande variabilité. La variabilité interne de l'essai, qui était inférieure à 15 % dans plus de 90 % des cas, n'a pas dépassé 30-40 %.

Note: la plupart des agents tensioactifs ne se composent pas d'une seule espèce moléculaire, mais sont des mélanges d'isomères, d'homologues, etc. qui se dégradent à l'issue de différentes périodes de latence et à différentes vitesses, et qui génèrent des courbes «brouillées», atténuées, de sorte que le seuil de 60 % risque de n'être pas atteint dans la fenêtre de dix jours, même si chaque espèce moléculaire atteindrait plus de 60 % en l'espace de dix jours si elle avait été testée isolément. Ce phénomène peut aussi s'observer avec d'autres mélanges complexes.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

15. Appareils courants de laboratoire et:
- flacons à sérum en verre fermés avec des bouchons en caoutchouc butylique serts de surcapsules en aluminium. La capacité recommandée est de 125 ml, soit un volume total d'environ 160 ml (dans ce cas, le volume de chaque flacon doit atteindre 160 ml avec une précision de 1 ml). Des flacons plus petits peuvent être utilisés si les résultats remplissent les conditions décrites aux paragraphes 66 et 67;
 - analyseur de carbone ou autre instrument (chromatographe en phase gazeuse, par exemple) pour mesurer le carbone inorganique;

▼ **M4**

- c) seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides;
- d) agitateur orbital dans un environnement thermostaté;
- e) source d'air exempt de CO₂ – on peut la préparer en faisant passer l'air à travers des granules de chaux sodée ou en utilisant un mélange gazeux à 80 % de N₂ et 20 % d'O₂ (facultatif) (voir paragraphe 28);
- f) appareil à membrane filtrante à pores de 0,20 à 0,45 µm (facultatif);
- g) analyseur de carbone organique (facultatif).

Réactifs

16. Tous les réactifs doivent être de qualité pour analyse.

Eau

17. On utilise de l'eau distillée ou désionisée dont la teneur en carbone organique total est ≤ 1 mg/l. Cela représente une quantité ≤ 5 % de la teneur initiale en carbone organique introduite par la dose recommandée de substance d'essai.

Solutions mères pour le milieu composé de sels minéraux

18. Les solutions mères et le milieu minéral sont similaires à ceux de la norme ISO 14593 (16) et des essais de «biodégradabilité facile» du chapitre C.4 (20). L'utilisation d'une concentration plus élevée de chlorure d'ammonium (2,0 g/l au lieu de 0,5 g/l) ne devrait être nécessaire que dans des cas très exceptionnels, par exemple lorsque la concentration de la substance d'essai est > 40 mg C/l. Les solutions mères doivent être gardées au froid et éliminées après six mois, ou avant si l'on remarque une précipitation ou une prolifération bactérienne. Préparer les solutions mères suivantes:

- a) Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) 8,50 g

Hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄) 21,75 g

Hydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na₂HPO₄·2H₂O) 33,40 g

Chlorure d'ammonium (NH₄Cl) 0,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4 (± 0,2). Si ce n'est pas le cas, préparer une autre solution;

- b) Chlorure de calcium dihydraté (CaCl₂·2H₂O) 36,40 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

- c) Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO₄·7H₂O) 22,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

- d) Chlorure de fer (III) hexahydraté (FeCl₃·6H₂O) 0,25 g

Dissoudre dans l'eau, porter le volume à 1 litre et ajouter une goutte de HCl concentré.

Préparation du milieu minéral

19. Mélanger 10 ml de la solution a) avec environ 800 ml d'eau (paragraphe 17), puis ajouter 1 ml des solutions b), c) et d) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau (paragraphe 17).

Autres réactifs

20. Acide phosphorique concentré (H₃PO₄) (> 85 % masse par volume).

▼ **M4***Solution d'hydroxyde de sodium 7M*

21. Dissoudre 280 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 1 litre d'eau (paragraphe 17). Déterminer la teneur en carbone inorganique dissous de cette solution et tenir compte de cette valeur dans le calcul du résultat de l'essai (voir paragraphes 55 et 61), notamment en fonction du critère de validité mentionné au paragraphe 66 b). Préparer une nouvelle solution si la concentration en carbone inorganique dissous est trop élevée.

Substance d'essai

22. Préparer une solution mère d'une substance d'essai suffisamment hydrosoluble, dans l'eau (paragraphe 17) ou dans le milieu d'essai (paragraphe 19), à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale à utiliser dans l'essai; il peut être nécessaire d'ajuster le pH de la solution mère. La solution mère doit être ajoutée au milieu minéral de telle sorte que la concentration finale de carbone organique atteigne entre 2 et 40 mg C/l, de préférence 20 mg C/l. Des concentrations plus faibles que celles mentionnées ci-dessus risquent de diminuer la précision. Les substances liquides solubles et insolubles peuvent être introduites directement dans les récipients à l'aide de seringues à haute précision. Les substances d'essai peu solubles et insolubles peuvent requérir un traitement spécial (25), à choisir parmi les suivants:

- a) ajout direct de quantités de poids connu;
- b) dispersion aux ultrasons avant l'ajout;
- c) dispersion à l'aide d'agents émulsifiants dont il y a lieu d'établir, avant d'ajouter la substance d'essai, s'ils exercent une action inhibitrice ou stimulante sur l'activité microbiologique;
- d) adsorption des substances d'essai liquides, ou d'une solution de la substance d'essai dans un solvant volatil approprié, sur un milieu ou un support inerte (par exemple un filtre en fibres de verre), suivie par l'évaporation du solvant, le cas échéant, et ajout direct de quantités connues;
- e) ajout d'un volume connu d'une solution de la substance d'essai dans un solvant suffisamment volatil pour qu'il s'évapore complètement du récipient, suivi par l'évaporation du solvant.

Il faut vérifier par un essai si les agents ou les solvants utilisés aux points c), d) et e) ont un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activité microbiologique [voir paragraphe 42 b)].

Substance de référence

23. Préparer une solution mère de la substance de référence (soluble) dans l'eau (paragraphe 17) à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale (20 mg C/l) à utiliser dans l'essai.

Vérification de l'inhibition

24. Il arrive souvent que les substances d'essai ne se dégradent pas de façon significative dans les conditions appliquées aux évaluations de la biodégradation immédiate. Cela peut résulter du fait que la substance d'essai exerce un effet inhibiteur sur l'inoculum à la concentration à laquelle elle est testée. Une vérification de l'effet inhibiteur peut être incluse dans la conception de l'essai pour faciliter l'identification (rétrospective) de l'inhibition comme l'une des causes possibles ou l'un des facteurs contributifs, soit, au contraire, pour éliminer cette possibilité d'interférences, ce qui démontrerait que la dégradation faible ou nulle n'est imputable qu'au fait que les micro-organismes n'attaquent pas la substance dans les conditions de l'essai. Afin d'obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (aérobies), on prépare une solution contenant la substance d'essai et la substance de référence dans le milieu d'essai (paragraphe 19), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir paragraphes 22 et 23).

▼ **M4***Inoculum*

25. L'inoculum peut provenir de différentes sources: boues activées, effluents d'eaux usées (non chlorés); eaux de surface et sols; ou d'un mélange de ces milieux (20). Il convient de vérifier l'activité biodégradante de la source à l'aide d'une substance de référence. Quelle que soit la source, il ne faut pas utiliser de micro-organismes ayant déjà été exposés à la substance d'essai pour l'essai de biodégradabilité facile.

Attention: les boues activées, les eaux usées et les effluents d'eaux usées renferment des organismes pathogènes et doivent être manipulés avec précaution.

26. On sait empiriquement que le volume optimal de l'inoculum est celui qui:
- suffit pour fournir une activité biodégradante adéquate,
 - dégrade la substance de référence dans le pourcentage stipulé (voir paragraphe 66),
 - fournit 10^2 à 10^5 unités formant colonie par millilitre dans le mélange final,
 - donne normalement une concentration de 4 mg/l de solides en suspension dans le mélange final lorsqu'on utilise de la boue activée; des concentrations allant jusqu'à 30 mg/l peuvent être utilisées, mais elles risquent d'augmenter sensiblement la production de CO_2 dans les témoins à blanc (26),
 - représente moins de 10 % de la concentration initiale de carbone organique introduite par la substance d'essai,
 - équivaut généralement à 1 à 10 ml d'inoculum par litre de solution expérimentale.

Boues activées

27. Prélever un échantillon de boue activée dans le bassin d'aération d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules à l'aide d'un tamis (possédant des orifices de 1 mm², par exemple) et conserver ensuite la boue en aérobiose jusqu'à son utilisation.
28. Une autre possibilité consiste, après avoir éliminé toutes les grosses particules, à laisser décanter la boue ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 minutes). Éliminer le surnageant. La boue peut être lavée dans la solution minérale. Suspendre la boue concentrée dans le milieu minéral de façon à obtenir une concentration de 3 à 5 g/l de matières en suspension. Aérer ensuite la suspension jusqu'à son utilisation.
29. La boue doit provenir d'une station d'épuration ordinaire en bon état de fonctionnement. Les boues issues d'une station d'épuration dont le débit est important, ainsi que les boues susceptibles de contenir des inhibiteurs, doivent être lavées. Décanter ou centrifuger la boue remise en suspension après agitation vigoureuse, éliminer le liquide surnageant et resuspendre la boue lavée dans un volume de milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que la boue puisse être considérée comme exempte de substrat en excès ou d'inhibiteur.
30. Prélever un échantillon de boue remise en suspension (lorsque la resuspension est complète) ou de boue non traitée juste avant le moment de son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension.
31. Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de solides en suspension). Passer la boue dans un mélangeur mécanique réglé sur une vitesse moyenne pendant 2 minutes. Laisser reposer la boue homogénéisée pendant 30 minutes, ou plus longtemps si nécessaire, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison d'environ 10 ml par litre de milieu minéral.

▼ **M4**

32. Il est possible d'obtenir une réduction plus importante du dégagement de CO₂ dans le témoin à blanc en aérant la boue toute une nuit avec de l'air exempt de CO₂. Dans cet essai, la concentration de l'inoculum doit s'élever à 4 mg/l de solides de boue activée (13).

Effluent secondaire d'eaux usées

33. L'inoculum peut également provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux usées domestiques. Conservé en aérobiose, l'échantillon sera utilisé le jour de son prélèvement ou préconditionné si nécessaire. L'effluent doit être filtré à travers un filtre grossier et son pH est mesuré.
34. Pour réduire la teneur en carbone inorganique du filtrat, on fait barboter dans celui-ci de l'air exempt de CO₂ [paragraphe 15 e)] durant 1 heure tout en maintenant le pH à 6,5 avec de l'acide phosphorique (paragraphe 20). La valeur du pH est ramenée à sa valeur de départ avec de l'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) et on laisse reposer le filtrat pendant environ 1 heure, avant d'y prélever un volume approprié de surnageant pour l'inoculation. Ce processus de barbotage diminue la teneur de l'inoculum en carbone inorganique. Par exemple, si on utilise le volume maximal recommandé d'effluent filtré et barboté (100 ml) par litre comme inoculum, la quantité de carbone inorganique présente dans les flacons témoins à blanc est comprise entre 0,4 et 1,3 mg/l (14), ce qui représente 2 à 6,5 % du carbone de la substance d'essai à 20 mg C/l et 4 à 13 % à 10 mg C/l.

Eaux de surface

35. Dans une eau de surface adéquate, on prélève un échantillon qui sera conservé en aérobiose et utilisé le jour même. Si nécessaire, l'échantillon est concentré par filtration ou centrifugation. Le volume d'inoculum à utiliser dans chaque récipient expérimental doit satisfaire aux critères énoncés au paragraphe 26.

Sols

36. Prélever un échantillon dans un sol approprié à une profondeur allant jusqu'à 20 cm en dessous de la surface du sol. Il convient d'enlever les pierres, les débris végétaux et les invertébrés de l'échantillon de sol avant de le passer au travers d'un tamis pourvu d'orifices de 2 mm (si l'échantillon est trop mouillé pour pouvoir être tamisé immédiatement, on le sèche partiellement à l'air). Il faut le garder en aérobiose et l'utiliser le jour même (si l'échantillon est transporté dans un sac noir de polythène fermé de manière non hermétique, il peut être conservé à 2 à 4 °C dans ce sac jusqu'à un mois).

Préconditionnement de l'inoculum

37. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté à la substance d'essai. Le préconditionnement peut diminuer le dégagement de CO₂ dans le témoin à blanc. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée, après l'avoir diluée dans le milieu expérimental à 30 mg/l, avec de l'air humide exempt de CO₂ durant 5 à 7 jours à la température de l'essai.

MODE OPÉRATOIRE*Nombre de flacons*

38. Le nombre de flacons [paragraphe 15 a)] requis pour un essai dépendra de la fréquence des analyses et de la durée de l'essai.
39. On recommande d'analyser les flacons en trois exemplaires, après un nombre suffisant d'intervalles de temps pour pouvoir identifier la fenêtre des dix jours. On analyse également au moins cinq flacons expérimentaux [paragraphe 15 a)] des séries a), b) et c) (voir paragraphe 42) à la fin de l'essai, afin de pouvoir calculer les intervalles de confiance à 95 % pour le pourcentage moyen de biodégradation.

▼ M4*Milieu ensemencé*

40. L'inoculum est utilisé à une concentration de 4 mg/l en solides secs de boue activée. Juste avant l'utilisation, préparer une quantité suffisante de milieu ensemencé en ajoutant, par exemple, 2 ml de boue activée traitée comme il convient (paragraphe 27 à 32) à une concentration de 2 000 mg/l à 1 litre de milieu minéral (paragraphe 19). Si l'on utilise un effluent secondaire d'eaux usées, ajouter jusqu'à 100 ml d'effluent (paragraphe 33) à 900 ml de milieu minéral (paragraphe 19) et porter à 1 litre avec du milieu.

Préparation des flacons

41. Verser des aliquotes de milieu ensemencé dans des flacons identiques en plusieurs exemplaires, de telle sorte que le rapport espace de tête/liquide soit de 1/2 (introduire, par exemple 107 ml dans des flacons de 160 ml de capacité). D'autres rapports peuvent être appliqués, mais il faut tenir compte de l'avertissement donné au paragraphe 11. Quel que soit le type d'inoculum utilisé, on veillera à mélanger correctement le milieu ensemencé pour qu'il se répartisse uniformément dans les flacons d'essai.
42. Préparer des séries de flacons [paragraphe 15 a)] destinés aux usages suivants:
- a) flacons d'essai (F_T) contenant la substance d'essai;
 - b) flacons témoins à blanc (F_B) ne contenant que le milieu expérimental et l'inoculum; tous les produits chimiques, solvants, agents ou filtres en fibres de verre utilisés pour introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux doivent aussi y être ajoutés;
 - c) flacons contenant la substance de référence (F_C) pour vérifier le procédé;
 - d) si nécessaire, flacons (F_I) pour vérifier un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence aux mêmes concentrations (paragraphe 24) que dans les flacons F_T et F_C respectivement;
 - e) flacons (F_S) pour vérifier une éventuelle dégradation abiotique; il s'agit des flacons (F_T) auxquels on a ajouté 50 mg/l de $HgCl_2$ ou qu'on a stérilisés d'une autre manière (à l'autoclave, par exemple).
43. Les substances d'essai et de référence solubles dans l'eau sont ajoutées aux flacons sous la forme de leurs solutions mères aqueuses (paragraphe 22, 23 et 24), de manière à fournir une concentration de 10 à 20 mg C/l.
44. Les substances d'essai et de référence insolubles sont ajoutées aux flacons de différentes façons [voir paragraphe 22 a) à e)] en fonction de la nature de la substance, avant ou après l'ajout du milieu ensemencé, selon la méthode de traitement de la substance. Si l'on utilise l'une des procédures exposées au paragraphe 22 a) à e), les flacons témoins à blanc (F_B) [paragraphe 42 b)] doivent être traités de manière identique, si ce n'est qu'ils ne contiendront ni la substance d'essai ni la substance de référence.
45. Les substances d'essai volatiles doivent être introduites dans des flacons hermétiquement clos (paragraphe 47) au moyen d'une microseringue. La dose est calculée en fonction du volume injecté et de la densité de la substance.
46. Si nécessaire, on ajoutera de l'eau aux flacons, afin que le volume de liquide soit identique dans tous les flacons. On s'assurera que le rapport espace de tête/liquide (généralement de 1/2) et la concentration de la substance d'essai sont tels que l'espace de tête renferme suffisamment d'oxygène pour permettre une biodégradation totale.

▼ **M4**

47. Tous les flacons sont ensuite fermés hermétiquement, par exemple au moyen de bouchons en caoutchouc butylique et de surcapsules en aluminium. Les substances d'essai volatiles doivent être ajoutées à ce stade (paragraphe 45). S'il y a lieu de mesurer la baisse de concentration du carbone organique dissous dans la solution expérimentale et d'analyser au temps zéro la concentration initiale de carbone inorganique ou d'autres paramètres [témoins stériles, paragraphe 42 e)], on prélève un échantillon approprié du flacon d'essai. Le flacon d'essai et son contenu sont ensuite éliminés.
48. Les flacons hermétiquement clos sont placés sur un agitateur rotatif [paragraphe 15 d)], réglé sur une vitesse d'agitation suffisante pour que le contenu du flacon reste bien mélangé et en suspension (par exemple 150 à 200 tpm), et mis à incuber dans l'obscurité à température constante ($20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Prélèvement

49. Le programme de prélèvement dépendra de la période de latence et de la vitesse de biodégradation de la substance d'essai. Des flacons sont retirés définitivement du dispositif expérimental afin d'être analysés le jour du prélèvement, lequel intervient au moins une fois par semaine ou plus fréquemment (par exemple deux fois par semaine), si une courbe de dégradation complète est requise. On retire le nombre nécessaire de flacons identiques de l'agitateur dans chaque catégorie: F_T , F_B et F_C et, le cas échéant F_I et F_S (voir paragraphe 42). L'essai dure normalement 28 jours. Si la courbe de biodégradation atteint un plateau avant 28 jours, l'essai peut s'arrêter avant 28 jours. Prélever des échantillons dans les cinq flacons réservés aux analyses à effectuer le 28^e jour et utiliser les résultats pour calculer les limites de confiance ou le coefficient de variation du pourcentage de biodégradation. Les flacons destinés à vérifier l'inhibition et la dégradation abiotique ne doivent pas faire l'objet de prélèvements aussi fréquents que les autres flacons; il suffira de deux prélèvements effectués respectivement le 1^{er} jour et le 28^e jour.

Analyse du carbone inorganique

50. On détermine la production de CO_2 dans les flacons en mesurant l'augmentation de la concentration de carbone inorganique durant l'incubation. Deux méthodes, décrites ci-après, sont recommandées pour mesurer la quantité de carbone inorganique produite durant l'essai. Au cours d'un même essai, il ne faudra utiliser qu'une seule méthode, car ces méthodes risquent de donner des résultats légèrement différents.
51. On recommande la méthode (a) si le milieu est susceptible de contenir des résidus, par exemple de papier filtre en verre et/ou d'une substance d'essai insoluble. Cette analyse peut être pratiquée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse, à défaut d'un analyseur de carbone. Il est important de maintenir les flacons à une température assez proche de la température de l'essai durant l'analyse du gaz de l'espace de tête. La méthode (b) peut s'avérer plus facile à appliquer par les laboratoires qui mesurent le carbone inorganique à l'aide d'un analyseur de carbone. Il importe que la solution d'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) utilisée pour convertir le CO_2 en carbonate soit fraîchement préparée ou que sa teneur en carbone inorganique soit connue, de telle sorte que ce paramètre puisse être pris en compte lors du calcul des résultats de l'essai [voir paragraphe 66 b)].

Méthode (a): acidification à $\text{pH} < 3$

52. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon de carbone inorganique approprié (par exemple une dilution 1 % poids/poids de CO_2 dans du N_2). Injecter de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement, afin d'abaisser le pH du milieu à une valeur < 3 (ajouter, par exemple, 1 ml à 107 ml de milieu expérimental). Remettre les flacons sur l'agitateur. Après avoir subi une agitation d'une heure à la température expérimentale, les flacons sont retirés de l'agitateur. On prélève des aliquotes de gaz (1 ml, par exemple) dans l'espace de tête de chaque flacon et on les injecte dans l'analyseur de carbone inorganique. Les concentrations de carbone inorganique mesurées sont notées en mg C/l.

▼ **M4**

53. Cette méthode repose sur le principe suivant lequel après l'acidification à $\text{pH} < 3$ et l'équilibrage à $20\text{ }^\circ\text{C}$, la constante d'équilibre de la répartition du CO_2 entre les phases liquide et gazeuse des flacons d'essai est égale à 1,0 lorsqu'elle est mesurée sous forme de concentration (13). Cette relation doit être démontrée au moins une fois pour le système expérimental, de la façon suivante:

Préparer des flacons contenant 5 et 10 mg/l de carbone inorganique à l'aide d'une solution de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) dans de l'eau exempte de CO_2 [préparer cette eau en l'acidifiant à $\text{pH} 6,5$ avec de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20), en y faisant barboter de l'air exempt de CO_2 toute une nuit et en ramenant le pH à une valeur neutre avec un produit alcalin]. S'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide est le même que dans les essais (1/2, par exemple). Acidifier et équilibrer comme indiqué au paragraphe 52 et mesurer les concentrations de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide. Vérifier que les deux concentrations sont identiques, à l'erreur expérimentale près. Si elles ne le sont pas, l'expérimentateur devra réexaminer les procédures. Il n'est pas nécessaire de vérifier la répartition du carbone inorganique entre les phases liquide et gazeuse à chaque essai; cette vérification pourrait être effectuée au cours de l'étalonnage.

54. S'il y a lieu de mesurer la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement), des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (non acidifiés), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, permettant de mesurer la biodégradation primaire.

Méthode (b): conversion du CO_2 en carbonate

55. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon adéquat, par exemple une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) dans de l'eau exempte de CO_2 (voir paragraphe 53), à une concentration de 0 à 20 mg de carbone inorganique/litre. Injecter une solution d'hydroxyde de sodium (7M, paragraphe 21) (par exemple à raison d'1 ml pour 107 ml de milieu) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement et agiter les flacons durant une heure à la température de l'essai. On utilise la même solution de NaOH dans tous les flacons retirés définitivement un jour donné, mais pas nécessairement pour tous les prélèvements effectués tout au long de l'essai. Si les valeurs absolues de la teneur en carbone inorganique des témoins à blanc sont requises à chaque prélèvement, il faudra déterminer la teneur en carbone inorganique de la solution de NaOH chaque fois qu'elle est utilisée. Enlever les flacons de l'agitateur et laisser reposer. Extraire un volume approprié (50 à 1 000 μl , par exemple) de la phase liquide de chaque flacon à l'aide d'une seringue. Injecter les échantillons dans l'analyseur de carbone inorganique et enregistrer les concentrations de carbone inorganique. On s'assurera que l'analyseur employé se prête au traitement des échantillons alcalins obtenus par cette méthode.
56. Cette méthode repose sur le principe selon lequel après l'ajout d'une solution alcaline et agitation, la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête est négligeable. Cela doit être vérifié au moins une fois pour le système expérimental. Il faut, pour ce faire, utiliser des étalons de carbone inorganique, ajouter une solution basique et équilibrer, et mesurer la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide (voir paragraphe 53). La concentration dans l'espace de tête devrait avoisiner zéro. Il n'est pas nécessaire de vérifier cette absorption pratiquement complète de CO_2 à chaque essai.
57. Si la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement) est à mesurer, des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (ne contenant pas de produit alcalin ajouté), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, pour mesurer la biodégradation primaire.

▼ **M4****RÉSULTATS ET RAPPORT****Calcul des résultats**

58. En supposant que la substance d'essai a été minéralisée à 100 % en CO₂, la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) des flacons d'essai excédant celle des témoins à blanc est égale au carbone organique total (COT) ajouté dans chaque flacon d'essai au début de l'essai, autrement dit:

$$\text{ThCI} = \text{COT}$$

La masse totale (mg) de carbone inorganique (CIT) dans chaque flacon est:

$$\begin{aligned} \text{CIT} &= (\text{mg de C dans le liquide} + \text{mg de C dans l'espace de tête}) \quad \text{Équation [1]} \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned}$$

où:

V_L = volume de liquide dans le flacon (litre);

C_L = concentration de carbone inorganique dans le liquide (carbone en mg/l);

V_H = volume de l'espace de tête (litre);

C_H = concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête (carbone en mg/l).

Les calculs du CIT pour les deux méthodes analytiques utilisées pour mesurer le carbone inorganique dans cet essai sont décrits ci-dessous aux paragraphes 60 et 61. Le pourcentage de biodégradation (% D) dans chaque cas est donné par l'équation suivante:

$$\%D = \frac{(\text{CIT}_t - \text{CIT}_b)}{\text{COT}} \times 100 \quad \text{Équation [2]}$$

où:

CIT_t = mg de CIT dans le flacon d'essai au temps t ;

CIT_b = la moyenne des mg de CIT dans les flacons témoins à blanc au temps t ;

COT = mg de COT ajoutés initialement au flacon d'essai.

Le pourcentage de biodégradation (% D) est calculé pour les flacons d'essai (F_T) et de référence (F_C) et, le cas échéant, les flacons (F_I) destinés à la vérification d'un éventuel effet inhibiteur, à partir des quantités respectives de carbone inorganique total produites jusqu'à chaque temps de prélèvement.

59. Une augmentation significative de la teneur en CIT dans les témoins stériles (F_S) durant l'essai permet de conclure à une dégradation abiotique de la substance d'essai et il faut en tenir compte dans le calcul de D dans l'équation [2].

Acidification à pH < 3

60. L'acidification à pH < 3 et l'équilibrage entraînant l'égalisation de la concentration de CIT entre les phases liquide et gazeuse, seule la concentration de carbone inorganique dans la phase gazeuse doit être mesurée. Aussi, d'après l'équation [1], $\text{CIT} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, où V_B = est le volume du flacon de sérum.

Conversion du CO₂ en carbonate

61. Dans cette méthode, les calculs sont effectués conformément à l'équation [1], mais la quantité négligeable de carbone inorganique dans la phase gazeuse est ignorée, de sorte que $V_H \times C_H = 0$, et $\text{CIT} = V_L \times C_L$.

▼ **M4****Expression des résultats**

62. On trace une courbe de biodégradation en reportant le pourcentage de biodégradation, D, en fonction du temps d'incubation, courbe qui indiquera, si possible, la phase de latence, la phase de biodégradation, la fenêtre des dix jours et la phase plateau, c'est-à-dire la phase durant laquelle la dégradation a atteint son maximum et où la courbe de biodégradation marque un palier. Si des résultats comparables sont obtenus pour les flacons d'essai (F_T) testés en parallèle (< 20 % de différence), on trace une courbe moyenne (voir appendice 2, figure 1); dans le cas contraire, on trace une courbe pour chaque flacon d'essai. On détermine la valeur moyenne du pourcentage de biodégradation dans la phase plateau ou on évalue sa valeur maximale (par exemple si la courbe fléchit dans la phase plateau), mais il est important d'estimer si, dans ce dernier cas, la valeur n'est pas nettement divergente. Ce niveau maximal de biodégradation doit être mentionné en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai» dans le rapport d'essai. Si le nombre de flacons d'essai s'est avéré insuffisant pour préciser une phase plateau, on utilise les données mesurées du dernier jour de l'essai pour calculer une valeur moyenne. Cette dernière valeur, la moyenne de cinq essais identiques, sert à indiquer la précision avec laquelle le pourcentage de biodégradation a été déterminé. La valeur obtenue au terme de la fenêtre des dix jours doit également figurer dans le rapport.
63. Tracer, de la même manière, une courbe pour la substance de référence, F_C , et, le cas échéant, pour la vérification de la dégradation abiotique F_S et pour le contrôle de l'inhibition, F_I .
64. Les quantités de CIT présentes dans les témoins à blanc (F_B) sont consignées, de même que celles présentes dans les flacons F_S , si ces flacons sont inclus dans le système expérimental.
65. Calculer D pour les flacons F_I , d'après le rendement théorique escompté en carbone inorganique provenant uniquement de la substance de référence du mélange. Si, au 28^e jour, $([D_{FC} (^{(1)}) - DF_I (^{(2)})]/D_{FC}) \times 100 > 25 \%$, il est permis de supposer que la substance d'essai a inhibé l'activité de l'inoculum, ce qui peut expliquer les faibles valeurs de D_{FT} obtenues dans les conditions de l'essai. Dans ce cas, l'essai pourrait être répété avec une concentration d'essai plus faible, et en réduisant de préférence le carbone inorganique dissous (CID) dans l'inoculum et le CIT formé dans les témoins à blanc, car une diminution de la concentration de la substance d'essai amoindrit la précision de la méthode. Un autre inoculum peut également être utilisé. Si la quantité de CIT dans le flacon F_S (dégradation abiotique) montre une augmentation significative (> 10 %), il se peut qu'une dégradation abiotique ait eu lieu.

(¹) Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence.

(²) Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_I .

«66. La validité d'un essai est établie si:

- a) le pourcentage moyen de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence est $>60\%$ au 14^{ème} jour de l'incubation; et
- b) la quantité moyenne de CIT présente dans les témoins à blancs F_B à la fin de l'essai est $< 3\text{ mg C/l}$.

Si ces limites ne sont pas atteintes, on répétera l'essai avec un inoculum provenant d'une autre source et/ou on révisera les procédures appliquées. Par exemple, si une production élevée de carbone inorganique dans le témoin à blanc pose un problème, il convient de suivre la procédure exposée aux paragraphes 27 à 32.»

▼M4

67. Si la substance d'essai ne fournit pas 60 % de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) et qu'il a été démontré qu'elle n'exerce aucun effet inhibiteur (paragraphe 65), l'essai peut être répété avec une concentration accrue d'inoculum (jusqu'à 30 mg/l de boue activée et 100 ml d'effluent/l) ou avec un inoculum provenant d'autres sources, en particulier si la dégradation a atteint une valeur comprise entre 20 et 60 %.

Interprétation des résultats

68. Si une substance d'essai atteint une biodégradation > 60 % de la ThCI dans la fenêtre des dix jours au cours de cet essai, cela démontre qu'elle est facilement biodégradable en aérobiose.
69. Si la valeur de seuil de 60 % de la ThCI n'a pas été atteinte, on mesure le pH du milieu des flacons qui n'ont pas été acidifiés ou alcalinisés; une valeur inférieure à 6,5 pourrait indiquer qu'une nitrification a eu lieu. Dans ce cas, on répète l'essai avec une solution tampon plus concentrée.

Rapport d'essai

70. Dresser un tableau du pourcentage de dégradation (% D) relevé dans chaque flacon d'essai (F_T), de référence (F_C) et, le cas échéant, de vérification de l'inhibition (F_I) pour chaque jour de prélèvement. Si les flacons identiques livrent des résultats comparables, tracer une courbe du % D moyen en fonction du temps. Noter la quantité de carbone inorganique total dans les témoins à blanc (F_B) et dans les témoins stériles (F_S), de même que le carbone organique dissous et/ou d'autres paramètres, ainsi que leur pourcentage de disparition.
71. Déterminer la valeur moyenne du % D dans la phase plateau ou utiliser la valeur maximale si la courbe de biodégradation fléchit dans la phase plateau et rapporter cette valeur en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai». Il importe de vérifier que dans ce dernier cas, la valeur la plus élevée n'est pas nettement divergente.
72. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes,
- pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales:

- référence à la présente méthode d'essai,
- description du système expérimental utilisé (par exemple, volume du flacon, rapport espace de tête/liquide, méthode d'agitation, etc.),
- ajout de la substance d'essai et de la substance de référence dans le système expérimental: concentration appliquée et quantité de carbone mesurée dans chaque flacon d'essai, et, le cas échéant, solvants utilisés,
- détails sur l'inoculum utilisé, traitement préalable et préconditionnement éventuels,
- température d'incubation,
- validation du principe de l'analyse du carbone inorganique,
- principales caractéristiques de l'analyseur de carbone inorganique employé (et de toute autre méthode d'analyse utilisée),
- nombre de répétitions.

Résultats:

- données brutes et valeurs calculées de la biodégradabilité présentées dans un tableau,

▼ **M4**

- graphique du pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances d'essai et de référence, phase de latence, phase de dégradation, fenêtre des dix jours et pente,
- pourcentage de disparition au niveau du plateau, à la fin de cet essai et après la fenêtre des dix jours,
- justification en cas de rejet des résultats expérimentaux,
- tout autre fait se rapportant à la procédure utilisée,
- analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Chapitre C.4 de la présente annexe Détermination de la biodégradabilité «facile» - Essai de dégagement de CO₂ (Méthode C.4-C).
- (2) Sturm R.N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J.A., Oil Chem Soc.* 50: 159-167.
- (3) Larson R.J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl Env. Microbiol.* 38: 1153-1161.
- (4) Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; révisée en 1999). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques – Essai de dégagement de dioxyde de carbone (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl Microbiol.* 30: 922-929.
- (9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801-812.
- (10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181-185.
- (11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. and Bailey P.H. (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51-53.
- (12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.
- (13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.
- (14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507-524.
- (15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527-1550.

▼ M4

- (16) ISO 14593, (1999) Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (essai au CO₂ – espace de tête).
- (17) Battersby N.S. (1997). The ISO headspace CO₂ biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999). An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.
- (20) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».
- (21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.
- (22) Chapitre C.11 de la présente annexe, Boues activées: essai d'inhibition de la respiration.
- (23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.
- (24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996) 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.

▼ **M4***Appendice 1*

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

CI: carbone inorganique.

ThCO₂: production théorique de CO₂ (mg); correspond à la quantité de dioxyde de carbone calculée à partir de la teneur en carbone connue ou mesurée de la substance d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celle-ci; également exprimée en mg de dioxyde de carbone dégagé par mg de substance d'essai.

COD: le carbone organique dissous est le carbone organique présent en solution ou qui traverse un filtre à pores de 0,45 micron ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 minutes à environ 4 000 g (40 000 m sec⁻²).

CID: carbone inorganique dissous.

ThCI: production théorique de carbone inorganique.

CIT: carbone inorganique total.

Facilement biodégradable: classification arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à certains essais de dépistage spécifiques portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on admet que de tels composés se dégraderont rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions aérobies.

Fenêtre des dix jours: les dix jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10 %.

Biodégradabilité intrinsèque: classification des produits chimiques pour lesquels une biodégradation (primaire ou finale) se manifeste sans ambiguïté au cours d'un quelconque essai de biodégradabilité.

Biodégradation ultime en aérobiose: niveau de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance d'essai a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiologiques (biomasse).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et en H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies.

Phase de latence: correspond à la période qui commence au début de l'essai et s'achève au moment où les micro-organismes dégradants se sont acclimatés et/ou adaptés et où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou d'une matière organique a atteint un niveau détectable (par exemple 10 % de la biodégradation maximale théorique, ou moins, suivant la précision de la technique de mesure).

Phase de dégradation: correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où on atteint 90 % du taux maximal de dégradation.

Phase plateau: phase au cours de laquelle la dégradation atteint sa valeur maximale et où la courbe de biodégradation marque un palier.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

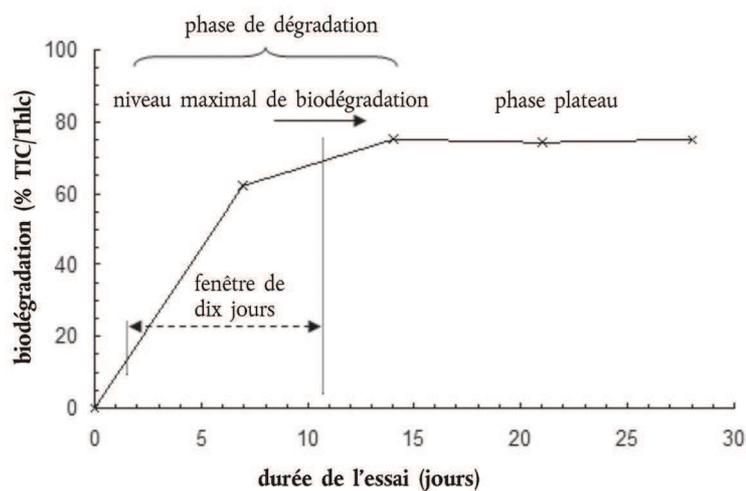
▼ M4

Appendice 2

Exemple de courbe de biodégradation

Figure 1

Biodégradation du 1-octanol au cours de l'essai de l'espace de tête
(dégagement de CO₂)



Glossaire

biodégradation.

phase de dégradation.

niveau maximal de biodégradation.

phase plateau.

fenêtre de dix jours.

durée de l'essai (jours).

▼M4

C. 30. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 317 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Parmi les méthodes d'essai relatives au devenir environnemental, celles intitulées «Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons» [chapitre C.13 de la présente annexe (49)] et «Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fousseurs» (53) ont été publiées, respectivement, en 1996 et en 2008. Il est difficile voire impossible d'extrapoler aux organismes terrestres comme les vers de terre les données sur la bioaccumulation en milieu aquatique. Des calculs de modèles fondés sur la lipophilie d'une substance d'essai, voir par exemple (14) ou (37), sont actuellement utilisés pour évaluer la bioaccumulation des substances chimiques dans le sol, notamment dans le document d'orientation technique de l'Union européenne (19). La nécessité d'appliquer une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques a déjà été exposée (55). Une telle méthode est particulièrement importante pour évaluer l'empoisonnement secondaire dans les chaînes alimentaires terrestres (4). Plusieurs méthodes d'essai nationales portent sur la bioaccumulation chez les organismes autres que les poissons, par exemple (2) et (72). Une méthode d'évaluation de la bioaccumulation chez les vers de terre (*Eisenia fetida*, Savigny) et les enchytrées dans des sols contaminés a été élaborée par l'American Society for Testing and Materials (ASTM) (3). Une méthode internationalement reconnue visant à déterminer la bioaccumulation dans un sol chargé permettra de mieux évaluer les risques des produits chimiques pour les écosystèmes terrestres, notamment (25) et (29).
2. Les invertébrés géophages sont exposés aux substances chimiques présentes dans le sol. Au nombre de ces animaux, les oligochètes terrestres jouent un rôle important dans la structure et la fonction des sols (15) (20). Les oligochètes terrestres vivent dans le sol et, partiellement, à sa surface (notamment sur la litière); ils représentent fréquemment l'espèce la plus abondante en termes de biomasse (54). Leur rôle dans la bioturbation du sol et leur fonction de proies confèrent à ces animaux une influence considérable sur la biodisponibilité des substances chimiques pour d'autres organismes comme les prédateurs invertébrés [dont les acariens et les coléoptères; voir notamment (64)] ou vertébrés [dont les renards et les mouettes (18) (62)]. Certaines espèces d'oligochètes terrestres actuellement utilisées dans les essais écotoxicologiques sont décrites à l'appendice 5.
3. Le guide de l'ASTM sur les essais en laboratoire consacrés à la toxicité du sol ou à la bioaccumulation chez les vers de terre *Eisenia fetida* et les enchytrées *Enchytraeus albidus* (3) fournit nombre d'informations essentielles qui ont servi à mettre en œuvre la méthode d'essai exposée ici sur la bioaccumulation dans le sol. Parmi les autres références citées dans la présente méthode d'essai figurent le chapitre C.13 de la présente annexe, intitulé «Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons» (49) et la ligne directrice 315 de l'OCDE intitulée «Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fousseurs» (53). Des expériences pratiques tirées d'études et de diverses publications sur la bioaccumulation dans le sol, dont (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), ont également largement inspiré la présente méthode d'essai.
4. Cette méthode d'essai s'applique essentiellement aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à être adsorbées dans le sol. Elle permet également d'évaluer la bioaccumulation de composés organo-métalliques stables, associés au sol. Cette méthode s'applique aussi aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces.

PRÉREQUIS

5. Les essais visant à mesurer la bioaccumulation d'une substance dans les oligochètes terrestres ont été réalisés avec des métaux lourds [voir notamment (63)] et des substances organiques persistantes dont le log K_{ow} (K_{oe}) se situe entre 3,0 et 6,0 (40). Ces essais s'appliquent également aux:

— substances dont le log K_{ow} est supérieur à 6,0 (substances super-hydrophobes),

▼ **M4**

- substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, par exemple les substances fortement adsorbantes ou tensio-actives,
 - substances qui présentent un potentiel de bioaccumulation de par leurs caractéristiques structurelles (analogues des substances dont le potentiel de bioaccumulation est connu),
 - métaux.
6. Avant de débiter toute étude, il convient de disposer de certaines informations sur la substance d'essai, comme le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le numéro CAS, la pureté, les mesures de sécurité, les conditions de stockage appropriées et les méthodes d'analyse. Il faut aussi connaître les propriétés suivantes de la substance:
- a) solubilité dans l'eau;
 - b) coefficient de partage octanol-eau, K_{ow} ;
 - c) coefficient de partage sol-eau, exprimé par K_{oc} ;
 - d) pression de vapeur;
 - e) dégradabilité (dans le sol ou l'eau notamment);
 - f) métabolites connus.
7. Il est possible d'utiliser des substances d'essai radiomarquées ou non. Cependant, l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée car elle facilite l'analyse. La décision d'y recourir dépendra des limites de détection ou de la nécessité de mesurer le composé parent et les métabolites. Dans le cas où une substance radiomarquée est utilisée et où le total des résidus radioactifs est mesuré, il est important que les résidus radiomarqués tant dans le sol que dans les organismes d'essai soient définis en pourcentages de la substance d'essai parente et de la substance marquée non-parente, par exemple dans des échantillons prélevés à un état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, pour permettre de calculer le facteur de bioaccumulation (FBA) pour la substance d'essai parente et les métabolites du sol pertinents (voir paragraphe 50). Il peut s'avérer nécessaire de modifier la méthode décrite ici, en particulier en vue de disposer d'une biomasse suffisante pour mesurer les substances d'essai organiques non-radiomarquées ou les métaux. Lorsque le total des résidus radioactifs est mesuré (par comptage en scintillation liquide après extraction, combustion ou solubilisation des tissus), le facteur de bioaccumulation est basé sur la substance d'essai parente et sur les métabolites. Il est préférable que le FBA soit calculé sur la base de la concentration de la substance d'essai parente dans les organismes et du total des résidus radioactifs. Ensuite, le facteur d'accumulation biota-sol (BSAF) (*biota-soil accumulation factor*), normalisé par rapport à la teneur en lipides des vers et à la teneur en carbone organique (CO) du sol, est calculé à partir du FBA pour garantir la comparabilité des résultats de différents essais de bioaccumulation.
8. Il convient que la toxicité de la substance d'essai envers les espèces utilisées dans l'essai soit connue, notamment la concentration d'effet (CE_x) ou la concentration létale (CL_x) pour la durée de la phase d'absorption [(19) par exemple]. La concentration de la substance d'essai représente de préférence environ 1 % de sa CL_{50} aiguë asymptotique, et elle est au moins dix fois supérieure à sa limite de détection dans le sol par la méthode d'analyse utilisée. La préférence est donnée, lorsqu'elles sont disponibles, aux valeurs de toxicité issues d'études à long terme sur les effets sublétaux observés (51) et (52). Si ces données ne sont pas disponibles, un essai de toxicité aiguë apportera des informations utiles [voir notamment (23)].

▼ **M4**

9. Il est nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier la substance dans les solutions d'essai, dans le sol et dans le matériel biologique; il est aussi nécessaire de disposer des détails de la préparation et du stockage des échantillons, et des fiches de données de sécurité des substances. Il convient également de connaître les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans le sol et les tissus du ver. Si une substance d'essai marquée au ^{14}C est utilisée, il est nécessaire de connaître aussi la radioactivité spécifique (c'est-à-dire en $\text{Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$) et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés. La radioactivité spécifique de la substance d'essai sera suffisamment élevée pour faciliter l'analyse et les concentrations d'essai utilisées ne provoqueront pas d'effets toxiques.
10. L'essai peut être réalisé sur sol naturel ou artificiel. Avant le début de l'essai, il convient de connaître les caractéristiques du sol naturel utilisé, par exemple son origine ou ses constituants, son pH, sa teneur en carbone organique, sa distribution granulométrique (pourcentages de sable, de limon et d'argile), et sa capacité de rétention d'eau (CRE) (3) (48).

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance d'essai se composent du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'appendice 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.
12. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (postexposition). Durant la phase d'absorption, des groupes répliqués de vers sont exposés au sol chargé avec la substance d'essai. En plus des animaux d'essai, des groupes témoins de vers sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai. Le poids sec et la teneur en lipides des organismes d'essai sont mesurés. Pour ce faire, on peut utiliser des vers du groupe témoin. Les valeurs de fond analytiques (essai à blanc) peuvent être obtenues en analysant des échantillons des vers et du sol témoins. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés dans un sol dépourvu de la substance d'essai. Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative. Elle permet de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (27). Si un état stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est préférable de déterminer les paramètres cinétiques – constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, facteur de bioaccumulation cinétique FBAk – en s'appuyant sur l'ajustement simultané des résultats des phases d'absorption et d'élimination. La concentration de la substance d'essai dans ou sur les vers est contrôlée pendant toute la durée des deux phases de l'essai.
13. Durant la phase d'absorption, des mesures sont effectuées pendant des temps de prélèvement pouvant durer jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (11) (12) (67). On identifie un état stationnaire lorsque le tracé de la concentration dans les vers en fonction du temps est parallèle à l'axe du temps, et lorsque trois analyses successives de la concentration réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de $\pm 20\%$ l'une par rapport à l'autre sur la base de comparaisons statistiques (par exemple, analyse de la variance, analyse de la régression).
14. La phase d'élimination consiste à transférer les organismes d'essai dans des récipients qui contiennent un substrat identique, mais sans la substance d'essai. Durant la phase d'élimination, les mesures sont réalisées pendant des durées pouvant aller jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre), à moins qu'une détermination analytique antérieure n'ait mis en évidence une diminution de 90 % des résidus de substance d'essai dans les vers. La concentration de la substance d'essai dans les vers à la fin de la phase d'élimination est consignée comme résidus non éliminés. Le facteur

▼ **M4**

de bioaccumulation à l'état stationnaire (*steady state*) (FBAss) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sol (C_s) à un état stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), c'est-à-dire comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sol (k_s) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) (voir l'appendice 1 pour les définitions) en supposant une cinétique du premier ordre (voir l'appendice 2 pour les calculs). Si la cinétique du premier ordre n'est manifestement pas applicable, il convient d'employer d'autres modèles.

15. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, si d'autres modèles ont été utilisés), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir d'équations de modèles à l'aide de programmes informatiques (voir l'appendice 2). La qualité de l'ajustement d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent une bonne qualité d'ajustement) ou de la loi du chi-deux. De plus la grandeur de l'écart-type ou de l'intervalle de confiance autour des paramètres estimés peut donner une bonne indication de la qualité de l'ajustement du modèle.

16. Pour réduire la variabilité des résultats pour les substances de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation sont exprimés par rapport à la teneur en lipides et à la teneur en carbone organique [teneur en kg de carbone organique (CO) du sol par teneur en kg de lipides des vers]. Cette approche s'appuie sur le fait que, pour certaines classes chimiques, il existe une relation claire entre le potentiel de bioaccumulation et la lipophilie; cette relation a été clairement établie pour le poisson (47). Il existe une relation entre la teneur en lipides du poisson et la bioaccumulation de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées [voir notamment (30) (44)]. Cette corrélation a également été démontrée pour les oligochètes terrestres (5) (6) (7) (14). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipides des animaux d'essai sur le même matériel biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Il est également possible de mesurer la teneur en lipides en utilisant des animaux témoins.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Pour qu'un essai soit valable, les critères suivants seront remplis tant concernant les animaux témoins que les animaux traités:
 - à l'issue de l'essai, la mortalité totale au cours des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 10 % (vers de terre) ou 20 % (enchytrées) du nombre total de vers introduits,

 - avec *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, la perte de poids moyenne mesurée à la fin des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 20 % du poids frais initial au début de chaque phase.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

18. Différentes espèces d'oligochètes terrestres sont recommandées pour les essais sur la bioaccumulation. Les espèces les plus couramment employées, *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (vers de terre) ou encore *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus* (enchytrées), sont décrites à l'appendice 5.

▼ M4**Appareillage**

19. Il convient d'éviter avec soin d'utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou d'adsorber la substance d'essai ou de laisser s'échapper des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Il est possible d'utiliser des récipients rectangulaires ou cylindriques standard, faits dans un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée, conforme au taux de charge, c'est-à-dire au nombre de vers d'essai. De l'acier inoxydable, du plastique ou du verre peut être utilisé pour tout équipement entrant en contact avec le milieu d'essai. Les récipients d'essai devront être fermés de manière appropriée, pour éviter que les vers ne s'échappent, tout en assurant un apport d'air suffisant. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthroides synthétiques. Dans ces cas de figure, l'équipement devra être jeté après usage (49). Il conviendra d'éviter l'évaporation des substances radiomarquées et des substances chimiques volatiles. On utilisera des pièges (par exemple des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus susceptibles de s'évaporer des récipients d'essai.

Sol

20. Il convient que le sol d'essai soit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront pouvoir s'enfouir dans le sol.
21. Il est recommandé d'utiliser comme substrat lors des essais le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe (48). La préparation du sol artificiel en vue d'essais sur la bioaccumulation est décrite à l'appendice 4, où figurent également des recommandations relatives au stockage de ce sol artificiel. Tout sol artificiel séché à l'air peut être stocké à température ambiante jusqu'à son utilisation.
22. Toutefois, il est possible d'utiliser des sols naturels provenant de sites non pollués comme sol d'essai et/ou d'élevage. Les sols naturels sont caractérisés au moins par leur origine (site de prélèvement), leur pH, leur teneur en carbone organique, leur distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), leur capacité maximale de rétention d'eau (CREmax), et leur teneur en eau (3). La recherche de micropolluants dans le sol ou dans ses constituants, préalablement à son utilisation, devrait fournir des informations utiles. En cas d'utilisation d'un sol naturel prélevé sur des terres agricoles, il convient que ce dernier n'ait pas été traité avec des produits phytopharmaceutiques ou n'ait pas fait l'objet d'un épandage de fumier d'animaux traités pendant au moins un an avant l'échantillonnage, ou d'un épandage d'engrais organiques pendant au moins six mois avant l'échantillonnage (50). Les procédures de manipulation des sols naturels avant utilisation dans le cadre d'essais écotoxicologiques sur des oligochètes en laboratoire sont décrites dans le document de l'ASTM (3). La durée de stockage des sols naturels au laboratoire est aussi courte que possible.

Application de la substance d'essai

23. La substance d'essai est incorporée dans le sol. Il convient de prendre en compte les propriétés physico-chimiques de cette substance. Une substance d'essai soluble dans l'eau est entièrement dissoute dans l'eau avant d'être mélangée au sol. La procédure de chargement recommandée pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau consiste à enrober un ou plusieurs des constituants du sol (artificiel) avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci, peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant organique adapté, lequel

▼ **M4**

est ensuite lentement évaporé jusqu'à dessiccation. La fraction enrobée peut ensuite être mélangée avec le sol mouillé. Cette procédure a pour principal avantage de n'introduire aucun solvant dans le sol. En cas d'utilisation d'un sol naturel, la substance d'essai peut être ajoutée soit par chargement d'une portion du sol séchée à l'air comme décrit précédemment pour le sol artificiel, soit par mélange avec le sol mouillé, puis évaporation si un agent de solubilisation est utilisé. En règle générale, il conviendra d'éviter autant que possible tout contact du sol mouillé avec les solvants. Les éléments suivants sont à prendre en considération (3):

- si un solvant autre que l'eau est utilisé, il convient qu'il soit miscible à l'eau et/ou puisse être éliminé (par évaporation notamment) pour ne laisser que la substance chimique d'essai sur le sol,
 - si un témoin solvant est utilisé, aucun témoin négatif n'est nécessaire. Le témoin solvant présentera la plus forte concentration de solvant ajouté au sol et le solvant en question sera issu du même lot que celui utilisé pour la solution mère. La toxicité et la volatilité du solvant ainsi que la solubilité de la substance d'essai dans le solvant sélectionné constituent les principaux critères de choix pour l'agent de solubilisation.
24. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai peuvent être mélangés, au moyen d'un mortier et d'un pilon par exemple, à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients d'essai. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié de 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai.
25. La concentration de la substance d'essai dans le sol est déterminée après chargement. La répartition homogène de la substance d'essai dans le sol est contrôlée avant l'introduction des organismes d'essai. La méthode de chargement choisie et les raisons de ce choix sont notées (24).
26. Idéalement, il convient d'établir un équilibre entre le sol et l'eau interstitielle avant l'ajout des organismes; une période de quatre jours à 20 °C est recommandée. Pour un grand nombre de substances chimiques organiques faiblement solubles dans l'eau, le laps de temps nécessaire pour qu'un véritable équilibre soit atteint entre les parties adsorbées et dissoutes peut s'étendre sur plusieurs jours ou plusieurs mois. Selon l'objectif de l'étude, par exemple lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire de «vieillir» plus longtemps le sol chargé [trois semaines à 20 °C pour les métaux notamment (22)].

Élevage des animaux d'essai

27. Il est préférable de conserver les vers en élevage de laboratoire permanent. Des conseils sur les méthodes d'élevage en laboratoire concernant *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, et les espèces enchytrées figurent à l'appendice 5 [voir aussi (48), (51) et (52)].
28. Il convient que les vers utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies, anomalies ou parasites observables.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

29. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. La phase d'absorption dure 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) sauf s'il est prouvé que l'état stationnaire a été atteint.

▼ **M4**

30. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés sur un sol dépourvu de la substance d'essai. Le premier échantillon est prélevé de 4 à 24 h après le début de la phase d'élimination. L'appendice 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 21 jours et une phase d'élimination de 21 jours.

Organismes d'essai

31. Chez de nombreuses espèces d'oligochètes terrestres, le poids individuel est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Enchytraeus albidus* et moins pour *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus*); la pesée et l'analyse chimique peuvent nécessiter de réunir les vers des récipients de répliquats (tous les vers d'un récipient de répliquat sont utilisés afin d'obtenir un seul résultat pour les tissus analysés). Vingt enchytrées sont ajoutés à chaque répliquat, et au moins trois répliquats sont utilisés. Si la limite de détection analytique de la substance d'essai est élevée, il peut être nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de vers. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*), il est possible de recourir à des récipients de répliquats contenant un seul individu.
32. Il convient que les vers de terre utilisés lors d'un essai soient de poids similaire (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ont par exemple un poids individuel de 250 à 600 mg). Les enchytrées (*Enchytraeus albidus* notamment) mesurent environ 1 cm de long. Tous les vers utilisés pour un même essai proviennent de la même source et sont adultes (avec un clitellum) (appendice 5). Le poids et l'âge d'un animal pouvant influencer sur les valeurs de FBA (par exemple, du fait d'une teneur en lipides variable et/ou de la présence d'œufs), ces paramètres sont consignés avec précision, et pris en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, des cocons sont susceptibles d'apparaître pendant la période d'exposition, ce qui a également des répercussions sur les valeurs de FBA. Il est recommandé de peser un sous-échantillon des vers avant l'essai afin d'estimer les poids humides et secs moyens.
33. Un rapport sol/vers élevé est utilisé afin de minimiser la baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption. Il est recommandé que ce rapport s'élève au minimum, pour *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, à 50 g de poids sec de sol par ver et, pour les enchytrées, à 10-20 g de poids sec de sol par récipient d'essai. La couche de sol contenu dans les récipients a une épaisseur de 2 à 3 cm (enchytrées) ou de 4 à 5 cm (vers de terre).
34. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits du milieu d'élevage (les enchytrées par exemple à l'aide de pinces de joaillier). Les animaux adultes sont transférés pour acclimatation sur un sol d'essai non traité, puis nourris (voir le paragraphe 36). Si les conditions d'essai diffèrent des conditions d'élevage, une phase d'acclimatation de 24 à 72 h devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions d'essai. Une fois acclimatés, les vers de terre sont transférés dans des récipients en verre (des boîtes de Petri par exemple) contenant une eau propre pour y être rincés, puis ils sont pesés avant d'être déposés sur le sol d'essai. Avant la pesée, tout excès d'eau est enlevé en tapotant délicatement les vers contre le bord du récipient ou en les séchant précautionneusement à l'aide d'une serviette en papier légèrement humidifiée.
35. Le comportement d'enfouissement des organismes d'essai est observé et consigné. Dans les essais menés avec des vers de terre, les animaux (témoins et traités) s'enfouissent dans le sol normalement en quelques heures; ceci est vérifié 24 h maximum après l'ajout des vers dans le récipient d'essai. Si ce n'est pas le cas (par exemple, plus de 10 % ne s'enfouissent pas pendant plus de la moitié de la phase d'absorption), soit les

▼ M4

conditions d'essai ne sont pas appropriées, soit les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé. Il conviendra alors d'arrêter l'essai et de le répéter. Les enchytrées vivant essentiellement dans les pores interstitiels du sol, il arrive souvent que leur tégument soit seulement partiellement en contact avec le substrat environnant. On suppose que l'exposition des enchytrées enfouies et non enfouies est équivalente, et le non-enfouissement des enchytrées n'exige pas nécessairement de répéter l'essai.

Alimentation

36. L'alimentation des organismes d'essai est envisagée si le sol utilisé présente une faible teneur en carbone organique total. Avec un sol artificiel, il est recommandé d'alimenter les vers suivant une fréquence hebdomadaire (une fois par semaine) à raison de 7 mg de fumier séché par gramme de masse sèche du sol pour les vers de terre, et de 2 à 2,5 mg de flocons d'avoine moulus par gramme de masse sèche du sol pour les enchytrées (11). La première ration est mélangée au sol immédiatement avant l'ajout des organismes d'essai. Il convient d'employer, de préférence, le même type d'alimentation que pour l'élevage (appendice 5).

Régime d'éclairage et température

37. Les essais sont menés suivant un cycle contrôlé de 16/8 heures de lumière/obscurité, avec une intensité lumineuse comprise de préférence entre 400 et 800 lx au niveau des récipients d'essai (3). La température est maintenue à 20 ± 2 °C tout au long de l'essai.

Concentrations d'essai

38. Une seule concentration est utilisée. Les cas où une ou plusieurs concentrations seraient requises font l'objet d'une justification. Si la toxicité (CE_x) de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée. Pour les métaux, la concentration devra être supérieure à la concentration de fond dans les tissus et le sol.

Réplicats

39. Concernant les mesures de cinétique (phase d'absorption et d'élimination), le nombre minimum de récipients de réplicats traités devra être de trois par point d'échantillonnage. Le nombre total de réplicats préparés suffira à couvrir tous les temps de prélèvement prévus au cours des phases d'absorption et d'élimination.
40. Pour les observations et les mesures biologiques (rapport poids sec/poids humide, teneur en lipides) et pour l'analyse des concentrations de fond dans les vers et le sol, au moins 12 récipients de réplicats d'un témoin négatif (quatre échantillons prélevés au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) sont fournis, si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de prévoir, en plus des réplicats traités, des témoins solvant (quatre récipients de réplicats devront faire l'objet d'un prélèvement au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) contenant tous les constituants, à l'exception de la substance d'essai. Dans ce cas, quatre récipients supplémentaires de réplicats d'un témoin négatif (sans solvant) pourront également être fournis pour procéder à un nouvel échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces réplicats pourront être comparés biologiquement avec le témoin solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. Il est recommandé de prévoir un nombre suffisant de récipients supplémentaires de réplicats de réserve (huit, par exemple) pour les vers traités et les vers témoins.

▼ **M4****Fréquence des mesures de la qualité du sol**

41. Le pH et le taux d'humidité du sol sont mesurés au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination. La température de la chambre d'essai est relevée en continu. Il convient de contrôler l'humidité du sol une fois par semaine en pesant les récipients d'essai et en comparant leur poids au moment des contrôles avec leur poids en début d'essai. Les pertes d'humidité sont compensées par l'ajout d'eau désionisée.

Échantillonnage et analyse des vers et du sol

42. L'appendice 3 donne un exemple de programme d'échantillonnage pour les phases d'absorption et d'élimination des essais de bioaccumulation sur les vers de terre et les enchytrées.
43. Un échantillon du sol est prélevé dans les récipients d'essai pour déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des vers, puis durant les phases d'absorption et d'élimination. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers et dans le sol. En règle générale, on mesure les concentrations totales dans le sol. On peut également mesurer les concentrations dans l'eau interstitielle; dans ce cas, il convient de justifier ce choix et de décrire les méthodes appropriées prévues avant le début de l'étude, puis de consigner ces informations dans le rapport.
44. Les vers et le sol sont échantillonnés au moins à six reprises durant les phases d'absorption et d'élimination. Si la stabilité d'une substance d'essai est démontrée, le nombre d'analyses du sol peut être réduit. Il est recommandé d'analyser au moins trois répliqués au début et à la fin de la phase d'absorption. Si la concentration mesurée dans le sol à la fin de la phase d'absorption s'écarte de la concentration initiale de plus de 30 %, les échantillons de sol prélevés à d'autres dates sont également analysés.
45. Enlever du sol les vers d'un répliquat donné à chaque temps de prélèvement (par exemple, après avoir étalé le sol du répliquat sur un plateau peu profond et prélevé les vers à l'aide d'une pince de joaillier), les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès (voir le paragraphe 34). Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser immédiatement, en incluant le contenu de l'intestin.
46. Les vers de terre (*Eisenia* sp.) doivent pouvoir purger leur intestin pendant la nuit, par exemple sur un papier filtre humide dans une boîte de Petri fermée (voir paragraphe 34). Après la purge, il convient de déterminer le poids des vers afin d'évaluer la perte éventuelle de biomasse pendant l'essai (voir les critères de validité au paragraphe 17). La pesée et l'analyse des tissus des enchytrées sont effectuées sans purge, ceci étant techniquement difficile en raison de la petite taille de ces vers. Une fois le poids final déterminé, les vers sont tués immédiatement, en utilisant la méthode la plus appropriée (par exemple avec de l'azote liquide, ou en congelant les vers à une température inférieure à - 18 °C).
47. Durant la phase d'élimination, les vers remplacent le contenu contaminé de leur intestin par des éléments du sol propre. Autrement dit, les mesures réalisées sur un échantillon de vers qui ne se sont pas purgés (les enchytrées en l'occurrence) immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sol contaminé présent dans l'intestin. S'agissant des oligochètes aquatiques, on suppose qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu intestinal contaminé a été remplacé par du sédiment propre [voir notamment (46)]. Des observations similaires ont été rapportées pour les vers de terre lors d'études sur l'accumulation de cadmium et de zinc radio-marqués (78). Chez les enchytrées ne s'étant pas purgés, la concentration de ce premier échantillon de la phase d'élimination peut être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la concentration de la substance d'essai par du sol non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.

▼ **M4**

48. Il est préférable d'analyser les échantillons de sol et de vers immédiatement après extraction (c'est-à-dire dans les 1 à 2 jours suivants) afin d'éviter des dégradations ou d'autres pertes, et il est recommandé de calculer les vitesses approximatives d'absorption et d'élimination pendant le déroulement de l'essai. Si l'analyse est retardée, les échantillons devront être stockés suivant une méthode appropriée, par exemple, en procédant à leur congélation (≤ -18 °C).
49. Il conviendra de vérifier que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai dans les échantillons de sol et de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée; l'efficacité d'extraction, la limite de détection et la limite de quantification devront être consignées. De même, il faudra s'assurer que la substance d'essai n'est pas détectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la concentration de fond. Si la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai C_a est > 0 pour les vers témoins, il faudra l'inclure au calcul des paramètres cinétiques (appendice 2). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum les contaminations et les pertes (résultant, par exemple, de l'adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).
50. En cas d'utilisation de substances d'essai radiomarquées, il est possible d'analyser le produit parent et les métabolites. Une quantification de la substance d'essai parente et des métabolites à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption fournit des informations importantes. Les échantillons sont alors nettoyés de façon à pouvoir quantifier séparément la substance d'essai parente. Si des métabolites simples excèdent 10 % de la radioactivité totale du ou des échantillons analysés, l'identification de ces métabolites est recommandée.
51. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sol, et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, sont consignées et rapportées.
52. Le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable pour les enchytrées, plus petits que les vers de terre. Si ce regroupement implique de réduire le nombre de répliqués, cela restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissances statistiques spécifiques sont requises, alors l'essai comprend un nombre adéquat de récipients de répliqués, adapté aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.
53. Il est recommandé d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids sec total et, si nécessaire (à savoir pour des substances fortement hydrophobes), comme une fonction de la teneur en lipides. La teneur en lipides est déterminée par des méthodes appropriées [certaines méthodes existantes, voir par exemple (31) ou (58), ont besoin d'être adaptées à cette fin]. Ces méthodes s'appuient sur une technique d'extraction au chloroforme/méthanol. Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il convient d'utiliser une version modifiée de la méthode de Bligh et Dyer (9) qui est décrite dans (17). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas forcément à des valeurs identiques, il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire si on dispose suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipides est, idéalement, analysée à partir du même échantillon ou extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie (49). Une autre possibilité consiste à mesurer la teneur en lipides sur des animaux témoins et à utiliser la valeur obtenue pour normaliser les valeurs de FBA. Cette dernière approche réduit la contamination de l'équipement par la substance d'essai.

▼ **M4****RÉSULTATS ET RAPPORT****Traitement des résultats**

54. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps, en échelle arithmétique. Lorsque la courbe atteint un plateau ou état stationnaire (voir les définitions à l'appendice 1), le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss) est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{C_a \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}{C_s \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}$$

C_a représente la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, et

C_s la concentration de la substance d'essai dans le sol.

55. Si la courbe n'atteint pas de plateau, le FBA_K , fondé sur les constantes de vitesse, devra être déterminé à la place du BAFss comme suit:
- déterminer le facteur d'accumulation (FBA_K) comme le rapport k_s/k_e ,
 - les vitesses d'absorption et d'élimination sont calculées de préférence simultanément (voir l'équation 11 à l'appendice 2),
 - La constante de vitesse d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c'est-à-dire du tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée en fonction de k_e et d'une valeur de C_a qui est dérivée de la courbe d'absorption – voir la description de ces méthodes à l'appendice 2. La méthode préférée pour l'obtention du FBA_K et des constantes de vitesse, k_s et k_e , consiste à utiliser des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres. Si la courbe d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, des modèles plus complexes devront alors être utilisés.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

Substance d'essai:

- toute information disponible sur la toxicité aiguë ou à long terme (par exemple CE_x , CL_x , CSEO) de la substance d'essai vis-à-vis des oligochètes fousseurs,
- pureté, état physique et propriétés physico-chimiques, par exemple $\log K_{ow}$, solubilité dans l'eau,
- données d'identification de la substance; provenance de la substance d'essai, identité et concentration des solvants éventuellement utilisés,
- en cas d'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, position précise des atomes marqués, radioactivité spécifique et pureté radiochimique.

Espèces d'essai:

- nom scientifique, souche, source, traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, taille, etc.

▼ **M4***Conditions d'essai:*

- procédure d'essai utilisée,
- type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s),
- protocole d'essai (par exemple, nombre et dimension des récipients d'essai, masse du sol et épaisseur de la couche de sol, nombre de réplicats, nombre de vers par réplicat, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage),
- justification du matériau choisi pour les récipients d'essai,
- méthode de préparation et d'application de la substance d'essai, ainsi que raisons du choix de la méthode,
- concentrations d'essai nominales, moyennes et écarts-types des valeurs mesurées dans les récipients d'essai, et méthode d'obtention de ces valeurs,
- source des constituants du sol artificiel ou – si un milieu naturel est utilisé – origine du sol, description d'un éventuel traitement préalable, résultats des contrôles (survie, augmentation de la biomasse, reproduction), caractéristiques du sol [pH, teneur totale en carbone organique, distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), capacité maximale de rétention d'eau (CRE_{max}), teneur en eau au début et à la fin de l'essai, et toutes autres mesures réalisées],
- informations détaillées sur le traitement des échantillons de sol et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures de chargement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai dans les vers et le sol, la teneur en lipides (si mesurée), et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats:

- mortalité des vers témoins et des vers dans chaque récipient d'essai et éventuel comportement anormal observé (par exemple, évitement du sol, absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation chez les enchytrées),
- rapport poids sec/poids humide du sol et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation),
- poids humides des vers à chaque temps de prélèvement; pour les vers de terre, poids humides au début de l'essai, et à chaque temps de prélèvement avant et après la purge de l'intestin,
- teneur en lipides des organismes d'essai (si déterminée),
- courbes montrant les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état stationnaire,
- C_a et C_s (avec écart-type et fourchette, si nécessaire) pour tous les temps de prélèvement (C_a exprimé en $g \cdot kg^{-1}$ de poids humide et sec du corps entier, C_s exprimé en $g \cdot kg^{-1}$ du poids humide et sec). Si un facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est nécessaire (par exemple, pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneurs en lipides différentes), C_a est en plus être exprimé en $g \cdot kg^{-1}$ de teneur en lipides de l'organisme et C_s est exprimé en $g \cdot kg^{-1}$ de carbone organique (CO) du sol,
- FBA (exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver), constante de vitesse d'absorption du sol k_s (exprimée en g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}), et constante de vitesse d'élimination k_e (exprimée en j^{-1}); éventuellement, BSAF (exprimé en kg de CO du sol kg^{-1} de teneur en lipides des vers),

▼ **M4**

- le cas échéant: pourcentages de substance parente, de métabolites et de résidus liés (c'est-à-dire le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans le sol et les animaux d'essai,
- méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats:

- conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'énoncés au paragraphe 17,
- résultats inattendus ou inhabituels, par exemple élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- (4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.
- (6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. & Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.
- (7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.
- (9) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- (10) Bouché M. (1972). Lombriciens de France. Écologie et systématique. INRA, Annales de zoologie-écologie animale, Paris, 671 p.
- (11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.
- (13) Conder J.M. and Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

- (14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W. (2003). Oligochaeta. In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, p. 555-576.
- (17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission (JO L 396 du 30.12.2006, p. 1).
- (20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996). *Biology and ecology of earthworms*. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- (21) OCDE (2008). Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fousseurs, ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No: 204 67 458: 149 pp. Le document peut être téléchargé à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- (24) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence, Série de la protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.
- (27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼ M4

- (29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.
- (31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.
- (32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-traeager, A. (eds), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998), Qualité du sol – Effets des polluants vis- à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*), Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.
- (36) Jaenike J. (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrillogica 4: 6-8.
- (37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.
- (38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.
- (39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.
- (40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.
- (41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.
- (43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.
- (44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.
- (45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.
- (46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼ **M4**

- (47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (49) Chapitre C.13 de la présente annexe, Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons.
- (50) Chapitre C.21 de la présente annexe, Microorganismes du sol: essai de transformation de l'azote.
- (51) OCDE (2004ba) Essai de reproduction chez l'enchytrée. Ligne directrice 220 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.
- (52) OCDE (2004b) Essai de reproduction chez le lombric (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Ligne directrice 222 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.
- (53) OCDE (2008) Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fousseurs. Ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.
- (54) Petersen H. and Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.
- (57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J. and Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/1999: 373 pp.
- (61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.
- (63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R. and Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. novembre, a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinae* 57: 93-100.

▼ M4

- (66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.
- (68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H., Edwards, P.J., Greig-Smith, P.W. & Heimbach, F.). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel C.A. and Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402–406.

▼ **M4***Appendice 1*

DÉFINITIONS

La bioaccumulation est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

La bioconcentration est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant de l'absorption de la substance exclusivement depuis le milieu environnant (à savoir via la surface du corps et le sol ingéré), par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

L'élimination d'une substance est la perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioaccumulation (FBA) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de l'essai de bioaccumulation, est la concentration de la substance d'essai dans ou sur l'organisme d'essai (C_a en g.kg^{-1} de poids humide ou sec de ver) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sol humide ou sec). Le FBA est exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver.

Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss), qui est le FBA à l'état stationnaire, ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sol sec) étant constante pendant cette période.

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption du sol divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e , voir ci-dessous), sont appelés facteurs de bioaccumulation cinétiques (FBA_K).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai, divisée par la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport au carbone organique, dans le sol à l'état stationnaire. C_a est alors exprimée en g.kg^{-1} de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en g.kg^{-1} de teneur en carbone organique du sol; le BSAF est exprimé en kg de CO.kg^{-1} de lipides.

Un plateau ou état stationnaire est défini comme l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de 20 % les uns des autres et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (49).

Le coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}) est le rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction de carbone organique d'un sol et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) est le rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; il est parfois exprimé par P_{ow} . Le logarithme de K_{ow} ($\log K_{ow}$) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

▼ M4

La phase d'absorption ou d'exposition est la durée pendant laquelle les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai.

La constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) est la valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase du sol. k_s est exprimé en g de sol kg^{-1} de ver j^{-1} .

La phase d'élimination est la durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu dépourvu de la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes d'essai.

La constante de vitesse d'élimination (k_e) est la valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant l'élément d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance. k_e est exprimé en j^{-1} .

Une substance d'essai est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ **M4***Appendice 2***Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination**

Le principal effet observé d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration dans l'organisme d'essai, C_a , par la concentration dans le sol, C_s , à l'état stationnaire. Si l'état stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA_K est calculé à partir des constantes de vitesse et non du FBAss. Il convient d'indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état stationnaire.

La procédure habituelle pour obtenir le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), la constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) et la constante de vitesse d'élimination (k_e) consiste à faire appel à des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres, par exemple à partir des modèles décrits dans (68). D'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et les équations de modèles:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 1]}$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[équation 2]}$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de ver j^{-1}]

C_s = concentration de la substance dans le sol [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j^{-1}]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption,

ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_K , k_s et k_e .

Lorsque la concentration de fond dans les vers non exposés, par exemple au jour 0, diffère sensiblement de zéro (cela peut être le cas pour les métaux notamment), cette concentration ($C_{a,0}$) est incluse dans ces équations comme suit:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 3]}$$

et

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[équation 4]}$$

Dans les cas où l'on observe une forte baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption, il est possible de recourir aux modèles suivants (par exemple, (67) et (79)):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad \text{[équation 5]}$$

▼ **M4**

où:

C_s = concentration de la substance dans le sol [g.kg⁻¹ de poids humide ou sec]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [d⁻¹]

C_0 = concentration initiale de la substance dans le sol [g.kg⁻¹ de poids humide ou sec]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k e^t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k e^{t_c}} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad \text{[équation 7]}$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [g.kg⁻¹ de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg⁻¹ de vers j⁻¹]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [j - 1]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j - 1]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption.

Lorsqu'on a atteint un état stationnaire durant la phase d'absorption (c'est-à-dire $t = \infty$), il est possible de réduire l'équation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k e^t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 1]}$$

à:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou à

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad \text{[équation 8]}$$

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) peut se calculer comme suit:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad \text{[équation 9]}$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sol, et f_{lip} est la fraction de lipides dans le ver, toutes deux étant déterminées, de préférence, sur des échantillons prélevés de l'essai, et basées respectivement soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Il est possible de modéliser les constantes cinétiques d'élimination en utilisant les données issues de la phase d'élimination et en appliquant l'équation de modèle suivante et une méthode informatisée non linéaire d'estimation des paramètres. Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, le déroulement temporel de l'élimination peut être décrit par un modèle à un compartiment (équation 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k e^t} \quad \text{[équation 10]}$$

▼ **M4**

Les processus d'élimination semblent parfois se dérouler en deux étapes, montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des éléments d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination [par exemple (27), (68)]. Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme, compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier la littérature pertinente, par exemple (38), (39), (40), (78).

À l'aide des équations de modèles ci-dessus, on peut également calculer les paramètres cinétiques (k_s et k_e) en une seule fois, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination simultanément. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter (41), (73) et (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad \text{[équation 11]}$$

Note: quand les paramètres d'absorption et d'élimination sont estimés simultanément à partir des données combinées d'absorption et d'élimination, «m» tel que mentionné dans l'équation 11 est un descripteur qui permet au programme informatique d'attribuer les sous-termes de l'équation aux ensembles de données de la phase correspondante et de faire une évaluation correcte (m = 1 pour la phase d'absorption; m = 2 pour la phase d'élimination).

Quoi qu'il en soit, ces équations de modèles seront utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai, ou (bio)dégradation, surviennent durant l'essai [voir notamment (79)].

▼ **M4***Appendice 3*EXEMPLES DE PROGRAMMES D'ÉCHANTILLONNAGE POUR DES
ESSAIS DE BIOACCUMULATION DANS LE SOL**Essai sur des vers de terre**

- a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

| Jour | Activité |
|-----------|---|
| - 6 | Conditionnement du sol préparé durant 48 h. |
| - 4 | Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux). |
| - 3 à - 1 | Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol. |
| 0 | Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation d'un nombre suffisant de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, des poids humide et sec, ainsi que de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé. |
| 1 | Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai. |
| 2 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 3 | Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température. |
| 4 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 5 – 6 | Comme le 3 ^e jour. |
| 7 | Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée. |
| 8 – 9 | Comme le 3 ^e jour. |
| 10 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 11 – 13 | Comme le 3 ^e jour. |
| 14 | Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée. |
| 15 – 16 | Comme le 3 ^e jour. |
| 17 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 18 – 20 | Comme le 3 ^e jour. |

▼ M4

| Jour | Activité |
|------|---|
| 21 | Comme le 1 ^{er} jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des répliquats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant. |
| | Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai. |
| | Les activités décrites pour le 3 ^e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés). |

b) Phase d'élimination

| Jour | Activité |
|----------------------------------|---|
| - 6 | Préparation et humidification des constituants du sol; conditionnement du sol préparé durant 48 h. |
| - 4 | Mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; incubation dans les conditions d'essai durant 4 jours. |
| 0 (fin de la phase d'absorption) | Mesure de la température et du pH du sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; ajout d'une ration alimentaire; transfert des vers des répliquats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre; prélèvement d'échantillons de sol et de vers après 4 à 6 h pour la détermination de la concentration de la substance d'essai. |
| 1 | Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai. |
| 2 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 3 | Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température. |
| 4 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 5 – 6 | Comme le 3 ^e jour. |
| 7 | Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée. |
| 8 – 9 | Comme le 3 ^e jour. |
| 10 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 11 – 13 | Comme le 3 ^e jour. |
| 14 | Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée. |
| 15 – 16 | Comme le 3 ^e jour. |
| 17 | Comme le 1 ^{er} jour. |

▼ **M4**

| Jour | Activité |
|---------|--|
| 18 – 20 | Comme le 3 ^e jour. |
| 21 | Comme le 1 ^{er} jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant. |
| | La préparation du sol avant le début de la phase d'élimination intervient de la même manière qu'avant la phase d'absorption. |
| | Les activités décrites pour le 3 ^e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés). |

Essai sur des enchytrées

- a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

| Jour | Activité |
|-----------|--|
| - 6 | Conditionnement du sol préparé durant 48 h. |
| - 4 | Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux). |
| - 3 à - 1 | Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol. |
| 0 | Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, du poids sec et humide et de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé. |
| 1 | Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai. |
| 2 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 3 | Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température. |
| 4 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 5 – 6 | Comme le 3 ^e jour. |
| 7 | Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée. |
| 9 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 10 | Comme le 3 ^e jour. |

▼ **M4**

| Jour | Activité |
|---------|--|
| 11 | Comme le 1 ^{er} jour. |
| 12 – 13 | Comme le 3 ^e jour. |
| 14 | Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant. |
| | Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai. |
| | Les activités décrites pour le 3 ^e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés) |

▼ **M4***Appendice 4***Sol artificiel – recommandations pour la préparation et le stockage**

Les sols naturels provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influencer sur l'essai; il est donc recommandé d'utiliser un substrat artificiel, le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre (48). Plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, se développer et se reproduire dans ce sol, et une normalisation maximum doublée d'une comparabilité intra- et interlaboratoire des conditions d'essai et d'élevage est proposée.

Constituants du sol:

| | | |
|-----------------------|-------|--|
| Tourbe: | 10 % | Tourbe de sphaigne, conformément à la ligne directrice 207 de l'OCDE (48). |
| Sable quartzique: | 70 % | Sable quartzique industriel (séché à l'air); taille des grains: plus de 50 % des particules seront dans une fourchette comprise entre 50 et 200 µm, mais toutes seront ≤ 2 mm. |
| Argile kaolinique: | 20 % | Teneur en kaolinite ≥ 30 %. |
| Carbonate de calcium: | ≤ 1 % | CaCO ₃ , pulvérisé, chimiquement pur. |

Il est également possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, notamment en abaissant la teneur en tourbe à 4-5 % de sol sec et en augmentant la teneur en sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers (74). Il a été démontré que *Enchytraeus albidus* et *Eisenia fetida* peuvent satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'ils sont testés sur des sols naturels dont la teneur en carbone organique est inférieure (2,7 %, par exemple) (33) et (61), et on a constaté expérimentalement qu'il pouvait en aller de même sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

Préparation

Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Ce mélange est réalisé environ une semaine avant le début de l'essai. Le mélange sec de constituants du sol est humidifié avec de l'eau désionisée au moins 48 h avant l'application de la substance d'essai de manière à équilibrer/stabiliser l'acidité. Pour déterminer le pH, on utilisera un mélange de sol et d'une solution de 1 M KCl suivant un rapport de 1/5. Si le pH ne se trouve pas dans la plage requise ($6,0 \pm 0,5$), soit on ajoute au sol une quantité suffisante de CaCO₃, soit on prépare un nouveau lot de sol.

La capacité maximale de rétention d'eau (CRE) du sol artificiel est déterminée conformément à la norme ISO 11268-2 (35). Au moins deux jours avant de démarrer l'essai, on humidifie le sol artificiel sec en ajoutant suffisamment d'eau désionisée ou reconstituée pour obtenir approximativement la moitié de la teneur finale en eau. Cette teneur finale en eau devrait représenter 40 % à 60 % de la CRE maximale. Au début de l'essai, on divise le sol préalablement humidifié en lots d'un nombre égal à celui des concentrations d'essai et des témoins utilisés pour l'essai, et, en employant la solution de la substance d'essai et/ou en ajoutant de l'eau désionisée ou reconstituée, on ajuste le taux d'humidité pour qu'il se trouve entre 40 et 60 % de la CRE_{max}. Le taux d'humidité est déterminé au début et à la fin de l'essai (à 105 °C). Il sera optimal pour satisfaire les exigences des espèces (le taux d'humidité peut aussi être contrôlé comme suit: le sol légèrement pressé dans la main doit laisser apparaître de petites gouttes d'eau entre les doigts).

▼ M4**Stockage**

Les constituants secs du sol artificiel peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Le sol préparé, préhumidifié peut être stocké dans un endroit frais pendant maximum trois jours avant d'être chargé; il convient de veiller à minimiser l'évaporation de l'eau. Un sol chargé avec la substance d'essai sera utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sol sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sol chargé peuvent alors être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à l'analyse.

▼ **M4***Appendice 5***Espèces d'oligochètes terrestres recommandées pour les essais de bioaccumulation dans le sol****Vers de terre**

L'espèce d'essai recommandée est *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), qui appartient à la famille des *Lumbricidae*. Depuis 1972, on la divise en deux sous-espèces [*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* (10)]. Selon Jaenike (36), il s'agit là de deux espèces à part entière. *Eisenia fetida* est facilement reconnaissable à ses larges bandes jaunes entre les segments alors qu'*Eisenia andrei* présente une couleur rouge foncé uniforme. Probablement originaires de la région de la mer Noire, elles sont aujourd'hui présentes partout dans le monde, surtout dans les habitats modifiés par les activités anthropiques comme les tas de compost. Toutes deux se prêtent à la réalisation d'essais écotoxicologiques et d'essais de bioaccumulation.

Eisenia fetida et *Eisenia andrei* sont disponibles dans le commerce, notamment comme appât pour la pêche. Par rapport à d'autres vers de terre de la même famille, ces deux espèces ont un cycle de vie court et atteignent leur maturité en 2 à 3 mois (à température ambiante). Leur température optimale oscille entre 20 et 24 °C. Elles préfèrent les substrats relativement humides, d'un pH presque neutre et à forte teneur en matière organique. Ces espèces étant largement utilisées dans les essais écotoxicologiques normalisés depuis environ 25 ans, leur élevage est bien établi (48) (77).

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déjections animales très diverses. Le milieu d'élevage recommandé par l'ISO (35) est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Le milieu aura un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5 % ou à 6 mS/cm) et ne sera pas trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Il est également possible d'utiliser de la terre de jardin, vendue dans le commerce, qui soit sans additifs, un sol artificiel tel que défini par l'OCDE (48), ou encore un mélange des deux, à parts égales (50/50). Le substrat sera humide, mais pas mouillé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la masse, il vaut mieux commencer l'élevage avec des cocons. À cet effet, des vers adultes sont ajoutés à une boîte d'élevage qui contient du substrat frais pour produire des cocons. L'expérience a montré qu'une densité démographique d'environ 100 vers adultes par kg de substrat (poids humide) donne de bons taux de reproduction. Après 28 jours, les vers adultes sont retirés. Les vers de terre éclos sont utilisés pour les essais une fois adultes, soit 2 mois plus tard au moins mais pas au-delà de 12 mois.

Les vers des espèces décrites précédemment peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. Une extrémité postérieure qui bouge très lentement ou qui est jaune (s'agissant d'*E. fetida*) indique un épuisement du substrat. Il est alors recommandé d'utiliser du substrat frais et/ou de réduire le nombre d'animaux par boîte.

Références bibliographiques complémentaires

Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtschaft. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼ **M4**

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytrées

L'espèce d'essai recommandée est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc). *Enchytraeus albidus* est l'une des plus grosses espèces (jusqu'à 15 mm) de la famille des annélides oligochètes (*Enchytraeidae*) et c'est la plus répandue dans le monde (8). *Enchytraeus albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (42). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

Enchytraeus albidus est disponible dans le commerce, plus particulièrement sous forme de nourriture pour les poissons. Il convient de vérifier si l'élevage est contaminé par d'autres espèces, généralement plus petites (60). Dans l'affirmative, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. De grands spécimens adultes d'*Enchytraeus albidus* sont ensuite sélectionnés (à l'aide d'un stéréomicroscope) pour commencer un nouvel élevage. Tous les autres vers sont éliminés. Le cycle de vie de ces vers est court puisqu'ils arrivent à maturité entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C). Seuls les vers ayant été conservés en laboratoire pendant au moins 5 semaines (une génération) sans problème devront être utilisés pour des essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, notamment *Enchytraeus luxuriosus*. L'univers de vie de cette espèce est le sol, comme récemment décrit dans (65). Si on utilise d'autres espèces d'*Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

L'espèce *Enchytraeus crypticus* (Westheide et Graefe, 1992) appartient au même groupe qu'*E. luxuriosus*. L'existence d'*Enchytraeus crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les élevages de lombrics et les tas de compost (Römbke, 2003). Par conséquent, on ne connaît pas ses besoins écologiques d'origine. Cependant, des études récemment menées en laboratoire avec différents sols naturels ont confirmé la grande tolérance de cette espèce vis-à-vis de propriétés du sol telles que le pH et la texture (Jänsch *et al.*, 2005). Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai (Kuperman *et al.*, 2003). Néanmoins, elle est petite (3-12 mm; 7 mm en moyenne) (Westheide et Müller, 1996), ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*Enchytraeus albidus*. Si on utilise cette espèce et non *Enchytraeus albidus*, les récipients d'essai peuvent être de plus petite taille, mais cela n'est pas nécessaire. En outre, il convient de considérer que cette espèce se reproduit très rapidement, son temps de génération étant inférieur à 20 jours à 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999), voire encore plus court à des températures supérieures.

Les *Enchytraeidae* de l'espèce *Enchytraeus albidus* (comme d'autres espèces d'enchytrées) peuvent être élevés dans de grandes boîtes en plastique (par exemple: 30 × 60 × 10 cm ou 20 × 12 × 8 cm, ce qui convient à la culture de vers de petite taille) remplies d'un mélange de sol artificiel et d'une terre de jardin, vendue dans le commerce, non contaminée et sans additifs. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune est retirée du sol d'élevage avant usage par triple congélation. Un sol entièrement artificiel est également envisageable, mais le taux de reproduction pourrait être moindre par rapport à celui obtenu avec des substrats mixtes. Il convient que le substrat présente un pH de 6,0 ± 0,5. Les vers sont conservés dans un incubateur à une température de 15 ± 2 °C sans lumière. Dans tous les cas, il convient d'éviter une température supérieure à 23 °C. Ce sol artificiel/naturel sera humide, mais pas mouillé. Légèrement pressé dans la main, il laissera apparaître de petites gouttes d'eau. Dans tous les cas, on évite de créer des conditions anoxiques (si on utilise un couvercle, ce dernier devra comporter un nombre de trous suffisamment élevé pour assurer un échange d'air approprié). Il convient d'aérer le sol d'élevage en le remuant délicatement une fois par semaine.

▼ **M4**

Les vers sont nourris au moins une fois par semaine ad libitum avec des flocons d'avoine placés dans une cavité à la surface du sol et recouverte de sol. Si de la nourriture reste de la fois précédente, il convient d'ajuster la ration alimentaire à ajouter. Si la nourriture restante est infestée de champignons, elle est remplacée par une nouvelle ration de flocons d'avoine. Pour favoriser la reproduction, les flocons d'avoine peuvent être remplacés toutes les deux semaines par une poudre protéique du commerce, enrichie en vitamines. Après trois mois, les animaux sont transférés vers un substrat d'élevage fraîchement préparé. Les flocons d'avoine, qui sont conservés dans des récipients hermétiquement fermés, sont passés à l'autoclave ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir toute infection par des acariens de stockage (*Glycyphagus* sp., Astigmata, Acarina, par exemple) ou des acariens prédateurs [*Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina, par exemple]. Une fois désinfectée, la nourriture est moulue de façon à pouvoir être facilement parsemée à la surface du sol. Il est également possible de nourrir les vers avec de la levure de boulanger ou de la nourriture pour poissons Tetra-Min®.

En règle générale, les conditions d'élevage sont satisfaisantes si les vers ne tentent pas de quitter le substrat, se déplacent rapidement dans le sol, présentent une surface brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, ont une couleur plus ou moins blanchâtre, et représentent diverses tranches d'âge. On peut considérer que les vers sont sains s'ils se reproduisent continuellement.

Références bibliographiques complémentaires

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

«C.47 Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 210 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les essais effectués sur les poissons au cours des premiers stades de leur vie sont destinés à déterminer les effets létaux et sublétaux des produits chimiques sur les stades de développement des espèces étudiées. Ils fournissent des informations précieuses pour l'évaluation des effets létaux et sublétaux chroniques de tel ou tel produit chimique sur d'autres espèces de poisson.
2. La ligne directrice 210, basée sur une proposition du Royaume-Uni qui a été examinée lors d'une réunion d'experts de l'OCDE tenue à Medmenham (Royaume-Uni) en novembre 1988, a été mise à jour en 2013 pour rendre compte de l'expérience de son utilisation et des recommandations formulées lors d'un atelier de l'OCDE sur les essais de toxicité pour les poissons qui s'est tenu en septembre 2010 (1).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les poissons aux premiers stades de leur vie sont exposés à une série de concentrations du produit chimique testé dissout dans l'eau. Les conditions dynamiques sont privilégiées; à défaut, des conditions semi-statiques sont néanmoins acceptables. Pour de plus amples informations, le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» devrait être consulté (2). Au début de l'essai, les œufs fécondés sont placés dans des enceintes d'essai; la durée de l'essai est variable selon les espèces, car elle est déterminée en fonction du temps nécessaire pour que les poissons témoins atteignent le stade juvénile. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et d'en déduire i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{20}) à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une modification de $x\%$ de l'effet mesuré. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée (voir les définitions à l'appendice 1).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

4. Le produit chimique d'essai désigne le produit soumis à l'essai. La solubilité dans l'eau (voir chapitre A.6 de la présente annexe) et la pression de vapeur (voir chapitre A.4 de la présente annexe) du produit chimique testé doivent être connues et il faut pouvoir disposer, pour doser le produit chimique dans les solutions d'essai, d'une méthode d'analyse fiable dont la précision et le seuil de détection sont connus. Bien qu'ils ne soient pas nécessaires pour mener l'essai, les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir chapitres C.1 ou C.49 de la présente annexe), effectué de préférence sur les mêmes espèces que celles sélectionnées pour le présent essai, peuvent être une source d'information précieuse.

5. Si la méthode d'essai est utilisée pour tester un mélange, la composition de ce dernier devrait être déterminée dans la mesure du possible, p.ex. par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leurs propriétés spécifiques (telles que mentionnées au paragraphe précédent). Avant d'utiliser la méthode d'essai pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.
6. Les informations suivantes sont utiles: formule structurale, pureté du produit chimique, solubilité dans l'eau, stabilité dans l'eau et à la lumière, pK_a , $P_{o/e}$ et résultats d'un essai de biodégradabilité facile (chapitres C.4 ou C.29 de la présente annexe, par exemple).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. Pour garantir la validité d'un essai, les conditions suivantes doivent être satisfaites:
 - la concentration d'oxygène dissous doit être > 60 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai;
 - à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de $\pm 1,5$ °C entre les différentes enceintes d'essai ou entre deux jours consécutifs, et elle doit être maintenue dans la gamme spécifiée pour l'espèce testée (appendice 2);
 - le dosage analytique des concentrations expérimentales est obligatoire.
 - le taux de survie des œufs fécondés et après éclosion dans les groupes témoins, y compris, s'il y a lieu, dans les témoins contenant le solvant, doit être supérieur ou égal aux valeurs limites définies à l'appendice 2.
8. En cas d'observation d'une légère déviation par rapport aux critères de validité, les conséquences doivent être considérées en fonction de la fiabilité des données, et ces considérations doivent être notées dans le rapport d'essai. Les effets sur la survie, l'éclosion ou la croissance observés dans l'enceinte témoin contenant le solvant, après comparaison avec le témoin négatif, doivent être notés dans le rapport et discutés dans le contexte de la fiabilité des données d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Enceintes d'essai

9. On peut utiliser tout récipient en verre, acier inoxydable ou autre matériau chimiquement inerte. Le silicone étant connu pour sa bonne capacité d'absorption des substances lipophiles, l'usage de tubes en silicone dans les essais dynamiques et celui de joints en silicone au contact de l'eau doivent être réduits au minimum par le choix d'aquariums en verre monoblocs, par exemple. Le récipient doit avoir des dimensions suffisantes pour permettre une croissance correcte dans l'enceinte témoin, le maintien de la concentration d'oxygène dissous (pour les espèces de petite taille, on utilisera, par exemple, un récipient d'une contenance de 7 L) et le respect du critère du taux de charge énoncé au paragraphe 19. Il est souhaitable de disposer les enceintes d'essai selon un schéma aléatoire, de préférence par bloc, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de façon complètement aléatoire. Les enceintes d'essai doivent être protégées de toute perturbation indésirable. Le système d'essai doit de préférence être préconditionné avec les concentrations du produit chimique testé sur une durée suffisamment longue, afin de démontrer la stabilité des concentrations d'exposition avant l'introduction des organismes d'essai.

Choix des espèces

10. Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1. Ceci n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces, mais il se peut que la méthode d'essai nécessite d'être adaptée afin d'offrir des conditions d'essai convenables. Dans ce cas, il faut justifier le choix de l'espèce et exposer la méthode expérimentale.

Soin des poissons géniteurs

11. On pourra trouver à l'appendice 3 et dans les références citées (3) (4) (5) des détails sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

Manipulation des œufs fécondés, des embryons et des larves

12. Au départ, les œufs fécondés, les embryons et les larves peuvent être exposés, à l'intérieur de la cuve principale, dans des récipients plus petits en verre ou en acier inoxydable pourvus de côtés ou d'extrémités constitués d'un filet permettant à la solution d'essai de traverser le récipient. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent à travers ces petits récipients en les suspendant à un bras disposé de façon à déplacer le récipient verticalement mais en gardant toujours les organismes submergés. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion.
13. Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves, conformément aux instructions données à l'appendice 3, sauf si ces filets sont destinés à empêcher les larves de s'échapper. En cas de transfert nécessaire des larves, il ne faut ni les exposer à l'air ni utiliser de filet pour les faire sortir des récipients contenant les œufs. Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et doit être signalé dans le rapport. Toutefois, le transfert n'est pas toujours nécessaire.

Eau

14. On utilise une eau dans laquelle l'espèce soumise à l'essai présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme (voir appendice 4). Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne puisse pas influencer sur le résultat de l'essai (par complexation du produit chimique d'essai, par exemple) ou avoir des effets néfastes sur la performance des poissons géniteurs, on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), de l'ammoniac, des pesticides organochlorés résiduels totaux, du carbone organique total et des solides en suspension sera effectué tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si l'on sait que la qualité de l'eau est variable, on augmentera la fréquence des dosages selon la variabilité de la qualité de l'eau. Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 4.

Solutions d'essai

15. Les essais dynamiques requièrent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère du produit chimique testé (par exemple une pompe doseuse, un diluteur proportionnel, un système de saturation) afin d'obtenir une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Pendant l'essai, on doit vérifier à intervalles réguliers le débit des solutions-mères et de l'eau de dilution; ceux-ci ne doivent pas varier de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes d'essai par 24 heures s'est avéré adéquat (3). Toutefois, si le taux de charge indiqué au paragraphe 19 est respecté, on peut tolérer un débit plus faible, équivalent à 2 ou 3 volumes d'enceintes d'essai, pour empêcher l'évacuation trop rapide de la nourriture.
16. Les solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique testé dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) ou des méthodes de dosage passif (6) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un solvant véhicule n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il convient de réaliser en parallèle un témoin contenant la même concentration de solvant que les solutions d'essai; en d'autres termes, il est préférable que la concentration de solvant soit identique dans les solutions d'essai contenant les concentrations testées et dans le témoin solvant. Cela peut se révéler difficile techniquement avec certains systèmes de dilution; dans ce cas, la concentration de solvant du témoin solvant doit être égale à la concentration de solvant la plus élevée des solutions d'essai. Pour les substances difficiles à tester, il convient de consulter le document d'orientation de l'OCDE n° 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (2). Si l'option du solvant est néanmoins retenue, le choix du solvant sera guidé par les propriétés chimiques du produit chimique testé concerné. Le document d'orientation de l'OCDE n° 23 recommande de ne pas dépasser une concentration de 100 µl/l. Pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (7), il est recommandé de choisir une concentration aussi faible que possible.
17. Si l'on opte pour un essai semi-statique, on peut utiliser deux méthodes différentes de renouvellement du milieu. Soit on prépare de nouvelles solutions d'essai dans des récipients propres et on transfère avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients, soit on maintient les organismes d'essai dans les récipients expérimentaux tout en changeant une partie (au moins les deux tiers) de la solution d'essai/du témoin.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition*Durée*

18. L'essai doit démarrer dès que possible après la fécondation des œufs, qui sont de préférence immergés dans les solutions d'essai avant que la division du blastodisque ne commence ou aussi tôt que possible après ce stade. La durée de l'essai dépendra de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées à l'appendice 2.

Charge

19. Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Les œufs doivent être répartis au hasard dans les différents groupes de traitement. Pour chaque concentration, on doit utiliser au moins 80 œufs, répartis de façon égale entre au moins quatre enceintes d'essai identiques. Le taux de charge (la biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment faible pour que la concentration d'oxygène dissous puisse être maintenue sans aération à au moins 60 % de la valeur de saturation en air durant les stades embryonnaire et larvaire. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l (poids humide) par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution à tout moment a été recommandé (3).

Lumière et température

20. La photopériode et la température de l'eau doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendice 2).

Alimentation

21. La nourriture et l'alimentation sont des points critiques, et pour chaque stade de développement, il est primordial de fournir la nourriture appropriée à partir d'un moment déterminé et dans des quantités suffisantes pour que la croissance soit normale. L'alimentation doit être à peu près identique dans tous les réplicats à moins d'un ajustement tenant compte de la mortalité. Les aliments non consommés ainsi que les excréta doivent être retirés quand cela s'avère nécessaire afin d'éviter l'accumulation de déchets. Des régimes alimentaires détaillés sont proposés à l'appendice 3 mais, avec l'expérience, la nourriture et les régimes alimentaires sont continuellement améliorés afin d'augmenter le taux de survie et d'optimiser la croissance. Les petits crustacés vivants enrichissent l'environnement et devraient donc remplacer la nourriture congelée ou déshydratée ou bien compléter ce régime alimentaire, à condition qu'ils conviennent à l'espèce et au stade de développement concernés.

Concentrations d'essai

22. Normalement, cinq concentrations du produit chimique testé (quatre réplicats au minimum par concentration) espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3.2 sont nécessaires. Il convient de prendre en considération les données disponibles sur la toxicité aiguë, obtenues de préférence à partir d'essais sur les mêmes espèces et/ou d'un essai de détermination de la plage de concentrations, devront être prises en considération (1) pour délimiter la gamme des concentrations d'essai. Cependant, toutes les sources d'informations devraient être prises en compte lors de la sélection des concentrations d'essai, y compris des données de substitution, des données issues d'essais de toxicité aiguës sur des embryons de poissons, etc. Un essai limite, ou un essai limite prolongé, impliquant moins de cinq concentrations comme l'essai proprement dit, peut être acceptable si l'on cherche à établir les CSEO de façon empirique uniquement. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations au-delà de la CL_{50} à 96 heures ou de 10 mg/l si la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Témoins

23. Outre la série de concentrations du produit chimique testé, il convient de réaliser un témoin contenant de l'eau de dilution et éventuellement, si nécessaire, un témoin contenant uniquement le solvant véhicule (voir paragraphe 16).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

24. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution du produit chimique testé dans tous les réplicats doit être vérifié (par dosage des concentrations d'essai, par exemple). Les méthodes analytiques nécessaires doivent être établies, y compris une limite de quantification (LQ) appropriée et des connaissances suffisantes sur la stabilité du produit chimique testé dans le système d'essai. Pendant l'essai, le dosage des concentrations du produit chimique testé est effectué à intervalles réguliers, l'objectif étant de caractériser l'exposition. Il est nécessaire de faire au moins cinq dosages. Si l'on utilise un système dynamique, on procède au moins une fois par semaine à des dosages analytiques du produit chimique testé à raison d'un réplicat par concentration, en changeant systématiquement d'échantillon. Le fait de procéder à des dosages analytiques supplémentaires permet souvent d'améliorer la qualité des résultats. On peut s'avérer nécessaire de filtrer les échantillons (avec des pores de 0,45 µm, par exemple) ou de les centrifuger pour éliminer les particules en suspension et s'assurer que les dosages se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie. Afin de réduire l'adsorption du produit chimique testé, les filtres doivent être saturés avant usage. Lorsque les concentrations ne sont pas maintenues dans un intervalle de 80-120 % de la concentration nominale, les concentrations effectives doivent être dosées et exprimées par rapport à la moyenne arithmétique des concentrations dans le cas des essais dynamiques [voir l'appendice 6 de la méthode d'essai C.20 pour le calcul de la moyenne arithmétique (8)], tandis qu'elles doivent être exprimées par rapport à la moyenne géométrique des concentrations mesurées dans le cas des essais semi-statiques; pour de plus amples informations, voir le chapitre 5 du document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (2).
25. Pendant l'essai, il convient de mesurer l'oxygène dissous, le pH et la température mesurés dans tous les récipients d'essai au moins une fois par semaine; si nécessaire, la salinité et la dureté doivent quant à elles être mesurées au début et à la fin de l'essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une cuve d'essai.

Observations

26. **Stade du développement embryonnaire:** il convient de vérifier aussi précisément que possible le stade embryonnaire au début de l'exposition au produit chimique testé. Ceci peut se faire en utilisant un échantillon représentatif d'œufs convenablement conservés et rendus translucides.
27. **Éclosion et survie:** il convient d'observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Si l'on observe la présence de champignons sur les œufs au début du stade de développement embryonnaire (le 1^{er} ou le 2^e jour de l'essai, par exemple), il faut compter et retirer les œufs en question. Les embryons, larves et juvéniles morts doivent être enlevés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement et être mis brisés par les autres poissons. En retirant les individus morts, il convient d'être extrêmement attentif à ne pas endommager physiquement les œufs et les larves adjacents. Les signes létaux varient selon les espèces et les stades de développement. Par exemple:
- pour les œufs fécondés: en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque;
 - pour les embryons, larves et juvéniles: immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou absence de réaction aux stimulations mécaniques.
28. **Apparence anormale:** il convient de noter le nombre de larves et de juvéniles présentant une anomalie corporelle, à des intervalles de temps adéquats qui dépendent de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Notons que, chez les larves et les juvéniles, l'anormalité est un phénomène naturel pouvant toucher de l'ordre de plusieurs pour cent des individus dans le(s) témoin(s) de certaines espèces. En cas de malformations et donc d'apparence anormale telles que l'organisme est en état de souffrance considérable et irréversible, l'organisme peut être retiré de l'essai. Les animaux concernés doivent être euthanasiés et comptabilisés comme morts aux fins de l'analyse statistique ultérieure. Le développement embryonnaire normal a été décrit pour la plupart des espèces recommandées dans la présente méthode d'essai (9) (10) (11) (12).
29. **Comportement anormal:** des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité ou un comportement alimentaire atypiques doivent être notées à des intervalles de temps adéquats, qui dépendent de la durée de l'expérience (une fois par jour pour les poissons d'eaux chaudes, par exemple). Ces effets, bien que difficiles à quantifier, peuvent, lorsqu'ils sont observés, contribuer à l'interprétation des résultats de mortalité.

30. **Poids:** à la fin de l'essai, tous les poissons ayant survécu dans chaque réplicat sont pesés (on note le nombre d'animaux présents dans le réplicat ainsi que le poids moyen par animal); il est préférable de noter le poids humide (poissons séchés par tamponnage), mais le poids sec peut également être consigné dans le rapport (13).
31. **Longueur:** à la fin de l'essai, les poissons sont mesurés. Il est recommandé de mesurer leur longueur totale, mais en cas de décomposition de la nageoire caudale ou d'érosion des nageoires, on peut utiliser la longueur standard. On utilisera la même méthode pour tous les poissons d'un essai donné. Les poissons peuvent être mesurés au moyen d'un pied à coulisse, d'un appareil photo numérique, d'un micromètre oculaire étalonné, etc. Les longueurs minimales types sont définies à l'appendice 2.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

32. Il est recommandé de s'assurer que le protocole d'essai et le test statistique sélectionné aient une puissance suffisante (80 % minimum) pour permettre de déceler les changements d'importance biologique concernant les critères d'évaluation de l'effet pour lesquels une CSEO doit être rapportée. Si une CE_x doit être rapportée, le protocole d'essai et le modèle de régression sélectionné doivent permettre l'estimation de la CE_x de telle sorte que (i) l'intervalle de confiance à 95 % rapporté pour la CE_x ne contienne pas zéro et ne soit pas trop large, (ii) l'intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne prévue à la CE_x ne contienne pas la moyenne des témoins, (iii) le modèle de régression ne présente pas un manque d'ajustement significatif aux données. L'une ou l'autre démarche nécessitent d'identifier la variation en pourcentage de chaque effet qu'il importe de déceler ou d'estimer. Le dispositif expérimental doit être conçu pour y parvenir. Lorsque les conditions de détermination de la CE_x décrites ci-dessus ne sont pas remplies, l'approche de type CSEO doit être utilisée. Il est peu probable que la même variation en pourcentage s'applique à tous les effets observés, et que l'on puisse concevoir une expérience réalisable qui remplisse ces critères pour tous les effets observés, aussi importe-t-il, lors de la conception de l'expérience, de se concentrer sur les effets à mesurer qui sont importants pour cette dernière. Des ordinogrammes d'analyse statistique et des orientations sur chaque démarche figurent aux appendices 5 et 6; ces outils aident au traitement des données et permettent de choisir le test ou modèle statistique le plus approprié.
33. Pour analyser les variations à l'intérieur de chaque ensemble de réplicats, il sera nécessaire d'utiliser l'analyse de la variance ou des méthodes avec tableau de contingence ainsi que des méthodes d'analyse statistique appropriées fondées sur cette analyse. Afin d'opérer des comparaisons multiples entre les résultats obtenus pour chaque concentration et ceux obtenus pour les témoins, le test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams est recommandé pour les réponses continues; un test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive est recommandé pour les réponses quantales (tout ou rien) qui correspondent à une relation concentration-réponse monotone et sans preuve de variance extra-binomiale (14). En cas de variance extra-binomiale avérée, il est recommandé d'utiliser le test de Cochran-Armitage modifié par Rao-Scott (15) (16), le test de Williams, le test de Dunnett (après transformation arc-sinus de la racine carrée) ou le test de Jonckheere-Terpstra appliqué à l'échelle des réplicats. Si les données ne correspondent pas à une relation concentration-réponse monotone, il pourra être utile de recourir au test de Dunnett, de Dunn ou de Mann pour les réponses continues et au test exact de Fisher pour les réponses quantales (14) (17) (18). La vigilance s'impose lorsqu'on applique une méthode ou un modèle statistique afin de s'assurer que les exigences liées à la méthode ou au modèle sont satisfaites (exemple: la variabilité d'une enceinte à l'autre est estimée et prise en compte dans le protocole d'essai ainsi que dans le test ou modèle utilisé). La normalité des données doit être évaluée; l'appendice 5 indique quel traitement doit être réservé aux résidus d'une analyse de la variance (ANOVA). L'appendice 6 traite d'autres considérations relatives à la démarche de régression. Des transformations doivent être envisagées pour respecter les exigences d'un test statistique. Cependant, les transformations visant l'ajustement d'un modèle de régression demandent beaucoup de précaution, sachant que, par exemple, une modification de 25 % de la réponse non transformée ne correspond pas à une modification de 25 % d'une réponse transformée. Dans toutes les analyses, ce n'est pas le poisson mais l'enceinte d'essai qui est l'unité d'analyse et l'unité expérimentale, un fait que les tests paramétriques et la régression devraient faire apparaître (3) (14) (19) (20).

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai:

Substance mono-constituant

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;
- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants

Espèce utilisée:

- nom scientifique, souche, origine, méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

Conditions d'essai:

- méthode utilisée: semi-statique ou dynamique, charge, etc.;
- photopériode;
- conception de l'essai: nombre d'enceintes d'essai et de réplicats, nombre d'œufs par réplicat, matériau et dimensions de l'enceinte d'essai (hauteur, largeur, volume), volume d'eau par enceinte d'essai, etc.;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent de solubilisation et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant);
- méthode de dosage du produit chimique testé: pompes doseuses, systèmes de dilution, etc.;
- efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie;
- caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si mesurée), carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée;
- qualité de l'eau dans les cuves d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;
- informations détaillées sur l'alimentation: type(s) d'aliment, provenance, quantité donnée, fréquence, etc.

Les résultats sont notés individuellement (ou pour chaque réplicat) sous forme de moyenne et de coefficient de variation, s'il y a lieu, pour les effets suivants:

- preuve que les témoins répondent à la norme d'acceptabilité relative à la survie globale de l'espèce (appendice 2);
- données sur la mortalité à chaque stade (embryonnaire, larvaire et juvénile) et la mortalité cumulée;
- jours des éclosions, nombre quotidien d'œufs éclos, et fin des éclosions;
- nombre de poissons sains à la fin de l'essai;
- données sur la longueur (préciser s'il s'agit de la longueur standard ou totale) et le poids des animaux survivants;
- fréquence et description et nombre d'anomalies morphologiques, s'il y a lieu;
- fréquence et description et nombre d'effets sur le comportement, s'il y a lieu;

- approche utilisée pour l'analyse statistique (analyse de régression ou analyse de la variance) et le traitement des données (test ou modèle statistique utilisé);
- concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses étudiées;
- concentration minimale avec effet observé (à $p = 0.05$) (CMEO) pour chacune des réponses étudiées;
- CE_x pour chacune des réponses étudiées, le cas échéant, et intervalles de confiance (à 90 % ou 95 %), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CE_x , pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs types.

Tout écart par rapport à la méthode d'essai.

Discussions des résultats, notamment concernant l'influence sur les résultats de l'essai d'un éventuel écart par rapport à la méthode d'essai.

Tableau 1

Espèces de poissons recommandées pour les essais

| EAU DOUCE | HABITATS ESTUARIENS et MARINS |
|--|--|
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel | <i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton |
| <i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule | <i>Menidia</i> sp. Capucette |
| <i>Danio rerio</i> Poisson-zèbre | |
| <i>Oryzias latipes</i> Medaka (japonais) | |

BBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 171, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. et R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. et B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, pp. 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- (8) Chapitre C.20 de la présente annexe: *Daphnia magna*, essai de reproduction.

- (9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
 - (10) Kimmel, H. B. *et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
 - (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
 - (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.
 - (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370 — 376.
 - (14) OCDE (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.
 - (15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
 - (16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
 - (17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
 - (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
 - (19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
 - (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

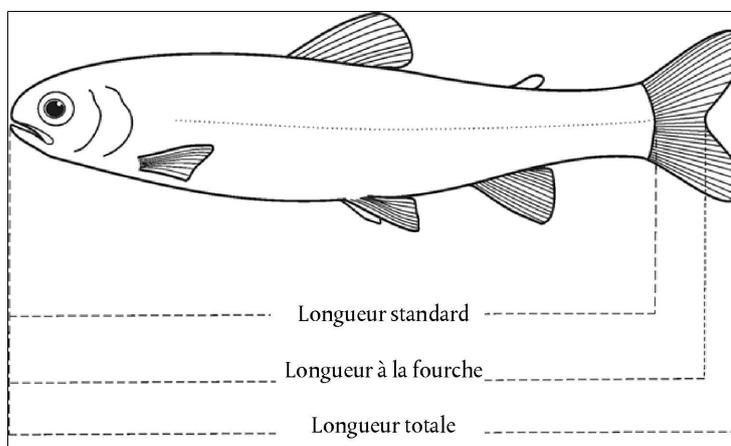
Longueur à la fourche (LF): longueur mesurée de la pointe du museau à l'extrémité des rayons centraux de la nageoire caudale, utilisée pour les poissons pour lesquels il est difficile de savoir où se termine la colonne vertébrale (www.fishbase.org).

Longueur standard (LS): longueur mesurée de la pointe du museau à l'extrémité postérieure de la dernière vertèbre ou à l'extrémité postérieure de la partie médio-latérale de la plaque hypurale. Autrement dit, cette mesure ne prend pas en compte la longueur de la nageoire caudale (www.fishbase.org).

Longueur totale (LE): longueur de l'extrémité du museau à l'extrémité du lobe le plus long de la nageoire caudale, généralement mesurée après avoir comprimé les lobes le long de la ligne médiane. La mesure se fait en ligne droite, sans suivre la courbe du corps (www.fishbase.org).

Figure 1

Description des différentes longueurs utilisées



Produit chimique: une substance ou un mélange

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'essai durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ 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.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'un produit chimique testé à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$) par rapport au témoin. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à ceux observés à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie. Les appendices 5 et 6 donnent des indications à ce sujet.

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition définie.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

IUPAC: Union internationale pour la chimie pure et appliquée.

SMILES: Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

| ESPÈCE | CONDITIONS D'ESSAI | | | DURÉE D'ESSAI RECOM-MANDÉE | Longueur totale moyenne minimale type des poissons témoins à la fin de l'essai (mm) ⁽¹⁾ | TAUX DE SURVIE DES TÉMOINS (% minimum) | |
|---|-------------------------|----------------------|------------------------|--|--|--|------------------|
| | Température (°C) | Salinité (‰) | Photopériode (hrs) | | | À l'éclosion | Après l'éclosion |
| Eau douce: | | | | | | | |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel | 10 ± 1,5 ⁽²⁾ | | 12 - 16 ⁽³⁾ | 2 semaines après alimenta-tion <i>ad libitum</i> des témoins (ou 60 jours après l'éclo-sion) | 40 | 75 % | 75 % |
| <i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule | 25 ± 1,5 | | 16 | 32 jours à compter du dé-but de l'essai (ou 28 jours après l'éclosion) | 18 | 70 % | 75 % |
| <i>Danio rerio</i> Poisson-zèbre | 26 ± 1,5 | | 12 - 16 ⁽⁴⁾ | 30 jours après l'éclosion | 11 | 70 % | 75 % |
| <i>Oryzias latipes</i> Medaka (japonais) | 25 ± 2 | | 12 - 16 ⁽⁴⁾ | 30 jours après l'éclosion | 17 | 80 % | 80 % |
| Habitats estuarins and marins: | | | | | | | |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton | 25 ± 1,5 | 15-35 ⁽⁵⁾ | 12 - 16 ⁽⁴⁾ | 32 jours à compter du dé-but de l'essai (ou 28 jours après l'éclosion) | 17 | 75 % | 80 % |
| <i>Menidia sp.</i> Capucette | 22 - 25 | 15-35 ⁽⁵⁾ | 13 | 28 jours | 20 | 80 % | 60 % |

La longueur totale moyenne minimale type ne constitue pas un critère de validité, mais les résultats inférieurs au chiffre indiqué doivent être examinés soigneusement par rapport à la sensibilité de l'essai.

⁽¹⁾ La longueur totale moyenne minimale est obtenue à partir d'une sélection de données disponibles à l'heure actuelle.

⁽²⁾ La souche particulière de truite arc-en-ciel étudiée peut nécessiter l'utilisation d'autres températures. Les poissons géniteurs doivent être maintenus à la même température que celle devant être utilisée pour les œufs. Après réception d'œufs du commerce, une adaptation de courte durée (1- 2 h, par exemple) à la température d'essai est nécessaire après leur arrivée.

⁽³⁾ Obscurité pour les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion sauf lors de leur inspection, puis éclairage tamisé pendant toute la durée de l'essai (photopériode de 12-16 heures)⁽⁴⁾.

⁽⁴⁾ Quelles que soient les conditions d'essai, les conditions d'éclairage doivent être constantes

⁽⁵⁾ Quel que soit l'essai, elle ne doit pas varier de plus de ±2‰.

ORIENTATIONS EN MATIÈRE D'ALIMENTATION ET DE MANIPULATION DES POISSONS-GÉNITEURS ET DES POISSONS D'ESSAI ISSUS DES ESPÈCES RECOMMANDÉES

| ESPÈCE | NOURRITURE (*) | | | | MOMENT DU TRANS-FERT APRÈS L'ÉCLOSION | MOMENT DE LA PREMIÈRE PRISE DE NOURRITURE |
|---|-------------------------|---|------------------------------------|---|--|--|
| | Poissons-géniteurs | Larves nouvellement écloses | Juveniles | | | |
| | | | Type | Fréquence | | |
| Eau douce: | | | | | | |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel | Nourriture pour truites | Aucune ^(a) | Nourriture de base pour truites NA | 2-4 fois par jour | 14-16 jours après l'éclosion ou à la remontée (facultatif) | 19 jours après l'éclosion ou à la remontée |
| <i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule | NA, flocons, AC | NA | NA48, flocons | 2-3 fois par jour | À partir de 90 % d'éclosion | 2 jours après l'éclosion |
| <i>Danio rerio</i> Posson-zèbre | NA, flocons | Larves disponibles dans le commerce, protozoaires ^(b) , protéines ^(c) | NA48, flocons | NA une fois par jour; flocons deux fois par jour | À partir de 90 % d'éclosion | 2 jours après l'éclosion |
| <i>Oryzias latipes</i> Medaka (japonais) | flocons | NA, flocons (ou protozoaires ou rotifères) | NA48, flocons (ou rotifères) | NA une fois par jour; flocons deux fois par jour <u>ou</u> flocons et rotifères une fois par jour | Sans objet | 6-7 jours après le frai |
| Habitats estuarins and marins: | | | | | | |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton | NA, flocons, AC | NA | NA48 | 2-3 fois par jour | Sans objet | 1 jour après l'éclosion /la remontée |
| <i>Menidia sp.</i> Silverside | NA48, flocons | NA | NA48 | 2-3 fois par jour | Sans objet | 1 jour après l'éclosion /la remontée |

(*) La nourriture doit être donnée à satiété. Le surplus et les excréta doivent être retirés quand cela s'avère nécessaire pour éviter l'accumulation de déchets.

AC artémies congelées; adultes du genre *Artemia*

NA nauplies d'artémies; fraîchement écloses

NA48 nauplies d'artémies; âgées de 48 h

^(a) les larves avec leur vitellus n'ont pas besoin de nourriture

^(b) filtrés à partir de cultures mélangées

^(c) granules provenant d'un processus de fermentation

Appendice 4

QUELQUES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ADMISSIBLE

| Paramètre | Concentration maximale |
|---|------------------------|
| Particules | 5 mg/l |
| Carbone organique total | 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | 1 µg/l |
| Chlore résiduel | 10 µg/l |
| Pesticides organophosphorés totaux | 50 ng/l |
| Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés | 50 ng/l |
| Chlore organique total | 25 ng/l |
| Aluminium | 1 µg/l |
| Arsenic | 1 µg/l |
| Chrome | 1 µg/l |
| Cobalt | 1 µg/l |
| Cuivre | 1 µg/l |
| Fer | 1 µg/l |
| Plomb | 1 µg/l |
| Nickel | 1 µg/l |
| Zinc | 1 µg/l |
| Cadmium | 100 ng/l |
| Mercure | 100 ng/l |
| Argent | 100 ng/l |

Appendice 5

GUIDE D'ORIENTATION POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA CSEO

Généralités

L'unité d'analyse est une série de réplicats. Ainsi, pour des mesures en continu telles que la taille, on calcule la moyenne ou la médiane des réplicats et les valeurs obtenues constituent les données destinées à l'analyse. La puissance des tests utilisés doit être démontrée, de préférence à partir d'une base de données historiques adéquate pour chaque laboratoire. L'ampleur de l'effet pouvant être détecté avec une puissance de 75-80 % doit être prévue pour chaque paramètre par le test statistique à utiliser.

Les bases de données disponibles au moment de l'élaboration de la présente méthode d'essai établissent la puissance possible selon les procédures statistiques recommandées. Le laboratoire doit démontrer sa capacité à répondre à cette exigence de puissance, soit en procédant à sa propre analyse de puissance, soit en démontrant que le coefficient de variation (CV) pour chaque réponse ne dépasse pas le 90^e percentile des CV utilisés pour développer la méthode d'essai. Le tableau 1 présente ces CV. Si l'on ne dispose que des moyennes et des médianes des réplicats, le CV intra-réplicats peut être ignoré.

Tableau 1

CV au 90^e percentile pour les espèces d'eau douce sélectionnées

| Espèces | Réponse | CV_inter-réplicats | CV_intra-réplicats |
|--------------------|----------|--------------------|--------------------|
| Truite arc-en-ciel | Longueur | 17,4 | 9,8 |
| | Poids | 10,1 | 28 |
| Tête-de-boule | Longueur | 16,9 | 13,5 |
| | Poids | 11,7 | 38,7 |
| Poisson-zèbre | Longueur | 43,7 | 11,7 |
| | Poids | 11,9 | 32,8 |

Pour la quasi-totalité des tests statistiques utilisés pour évaluer les études toxicologiques en laboratoire, les comparaisons intéressantes concernent les groupes de traitement par rapport aux témoins. Ainsi, il n'y a pas lieu d'exiger un test F ANOVA statistiquement significatif avant d'utiliser le test de Dunnett ou de Williams, ou un test statistiquement significatif de Kruskal-Wallis avant d'utiliser le test de Jonckheere-Terpstra, de Mann-Whitney ou de Dunn (Hochberg et Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Le test de Dunnett permet des comparaisons multiples, et le fait d'utiliser le test F comme référence affecte négativement les taux de faux positifs et de faux négatifs. De même, le test de Williams et celui de Jonckheere-Terpstra utilisant un niveau de significativité de 0,05 à chaque étape conservent un taux global de faux positifs de 5 %, et ce taux ainsi que la puissance des tests sont affectés négativement par l'utilisation du test F ou du test de Kruskal-Wallis comme référence. Le test de Mann-Whitney et le test de Dunn doivent être corrigés aux fins de comparaison multiple et il est conseillé de leur appliquer une correction de Bonferroni-Holm.

On trouvera dans OCDE (2006) un examen approfondi de la plupart des recommandations sur les tests paramétriques et la vérification des hypothèses sous-jacentes à ces tests, ainsi qu'une bibliographie détaillée.

Traitement des témoins en cas d'utilisation d'un solvant

Si l'on utilise un solvant, on doit prévoir un témoin-eau et un témoin-solvant. Les deux témoins doivent être comparés pour chaque réponse et combinés en vue de l'analyse statistique s'ils ne présentent aucune différence significative. Sinon, on doit utiliser le témoin-solvant pour le dosage de la CSEO ou l'estimation de la CE_x et ne pas utiliser le témoin-eau. Voir la restriction applicable aux critères de validité (paragraphe 7).

En ce qui concerne la longueur, le poids, la proportion d'œufs éclos, le taux de mortalité larvaire ou la proportion de larves anormales, et le premier ou le dernier jour de frai ou de remontée, un test T ou un test de Mann-Whitney doit être utilisé pour comparer les témoins au niveau de significativité de 0,05, en ignorant tous les groupes de traitement. Les résultats de ces tests doivent être notés dans le rapport.

Observations morphologiques (longueur et poids)

La longueur et le poids des poissons peuvent être distribués selon une loi normale ou log normale. Dans les deux cas, les valeurs moyennes par réplicat ont tendance à être normalement distribuées en vertu du théorème de la limite centrale et confirmées par les données provenant de plus d'une centaine d'études relatives aux stades de vie précoce de trois espèces d'eau douce. Par ailleurs, si les données ou les bases de données historiques font apparaître une distribution log normale en ce qui concerne les valeurs relatives à la taille des poissons, le logarithme des valeurs moyennes par réplicat peut être calculé, et les données pour l'analyse peuvent alors être les anti-logarithmes de ces logarithmes de moyennes par réplicat.

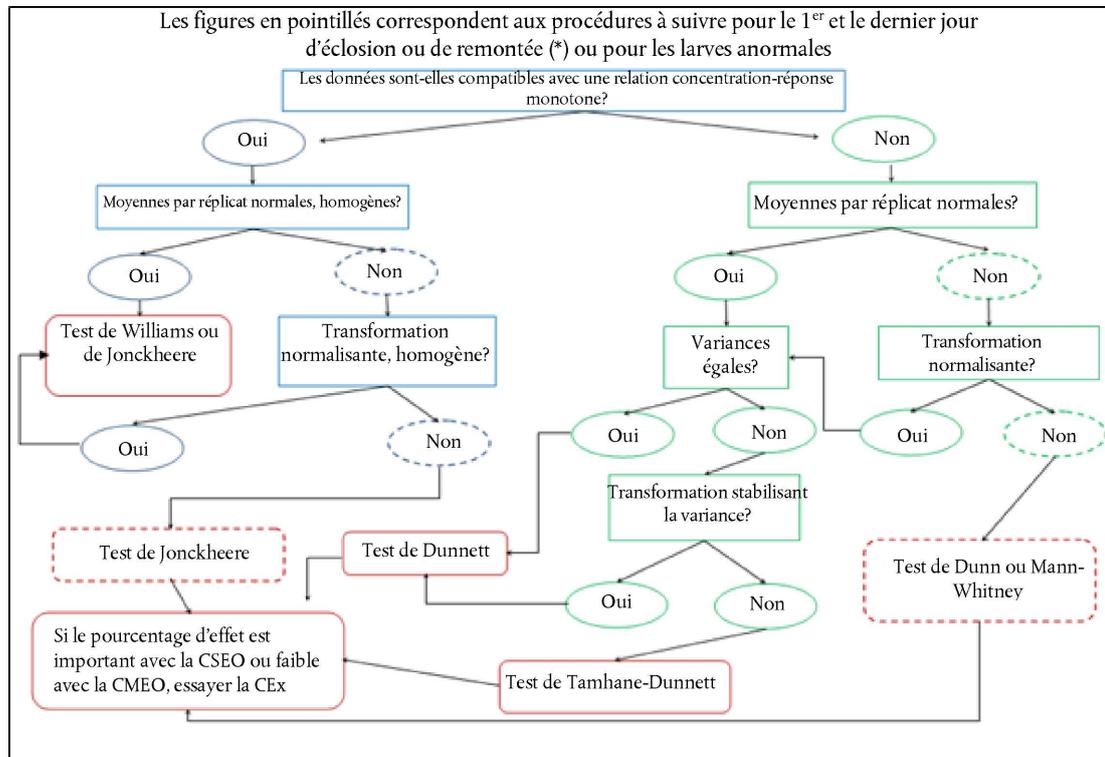
L'évaluation doit porter sur la compatibilité des données avec une distribution normale et une homogénéité de la variance. A cet effet, on utilisera les résidus d'un modèle ANOVA où la concentration est la seule variable explicative. On peut avoir recours à la représentation sous forme de nuages de points et d'histogrammes ou bien de diagrammes à tiges et à feuilles. Sinon, on peut utiliser un test formel comme celui de Shapiro-Wilk ou d'Anderson-Darling. Il est possible d'évaluer la compatibilité des données avec l'homogénéité de la variance par un examen visuel du même nuage de points ou formellement grâce au test de Levene. L'évaluation de la normalité et de l'homogénéité de la variance est obligatoire uniquement pour les tests paramétriques (Williams, Dunnett, etc.).

Une attention particulière doit être accordée aux éventuelles valeurs aberrantes et à leurs effets sur l'analyse. On peut avoir recours au test de Tukey et procéder à l'inspection visuelle des mêmes points de résidus décrits ci-dessus. Il convient de rappeler que les observations sont des réplicats entiers, de sorte que l'omission d'une aberration de l'analyse ne doit être effectuée qu'après un examen attentif.

Les tests statistiques qui font appel aux caractéristiques du protocole expérimental et de l'attente biologique sont des tests de tendance régressifs comme le test de Williams ou celui de Jonckheere-Terpstra. Ces tests supposent une relation concentration-réponse monotone, et il faut vérifier que les données sont compatibles avec cette hypothèse. Cela peut être fait visuellement à partir d'un nuage de points des moyennes par réplicat par rapport à la concentration d'essai. Il sera utile de superposer ce nuage de points avec un diagramme linéaire reliant les concentrations moyennes pondérées par la taille d'échantillonnage dans le réplicat. Un écart important de ce diagramme linéaire par rapport à la monotonie indiquerait qu'il faut peut-être avoir recours à des tests non paramétriques. Par ailleurs, il est possible d'avoir recours aux tests formels. Un test formel simple consiste à calculer les contrastes linéaires et quadratiques des moyennes de concentrations. Si le contraste quadratique est significatif et que le contraste linéaire ne l'est pas, cela indique qu'il peut y avoir un problème avec la monotonie, qui devra alors être évaluée à partir des points. S'il peut y avoir un problème avec la normalité ou l'homogénéité de la variance, ces contrastes pourront être construits à partir de données hiérarchisées. Il est possible d'utiliser d'autres tests, tels que le test de Bartholomew (pour la monotonie), mais ces tests accroissent la complexité.

Figure 2

Logigramme pour la CSEO — observations morphologiques (longueur et poids)



(*) Ces réponses ne corroborent jamais les hypothèses en cas de modèles ou d'analyses paramétriques

À moins que les données ne soient pas conformes aux exigences des tests de Williams et de Jonckheere-Terpstra, on utilise ces tests pour déterminer la CSEO. On trouvera dans OCDE (2006) des informations détaillées sur ces procédures. Si les données sont non conformes aux exigences d'un test de tendance régressif, on peut utiliser le test de Dunnitt ou celui de Tamhane-Dunnitt (T3), qui permettent tous deux des comparaisons multiples. Ces tests supposent la normalité et, dans le cas du test de Dunnitt, l'homogénéité de la variance. Si ces conditions ne sont pas remplies, on peut utiliser le test non paramétrique de Dunn. On trouvera dans OCDE (2006) des informations détaillées sur l'ensemble de ces tests. La figure 2 donne une vue d'ensemble permettant de choisir le test approprié.

Éclosion des oeufs et survie des larves

Les données à analyser sont les proportions d'oeufs qui éclosent ou de larves qui survivent dans chaque réplicat. Ces proportions doivent être évaluées sous l'angle de la variance extra-binomiale, qui est fréquente mais pas universelle pour ces mesures. L'organigramme de la figure 3 donne des indications pour le choix du test approprié; le texte apporte des explications détaillées.

Deux tests sont couramment utilisés: celui de la $C(\alpha)$ de Tarone (Tarone, 1979) et des tests du χ^2 , chacun étant appliqué séparément à chaque concentration d'essai. En cas d'observation d'une variance extra-binomiale, même dans une seule concentration d'essai, les méthodes qui s'en accommodent doivent être utilisées.

Formule 1

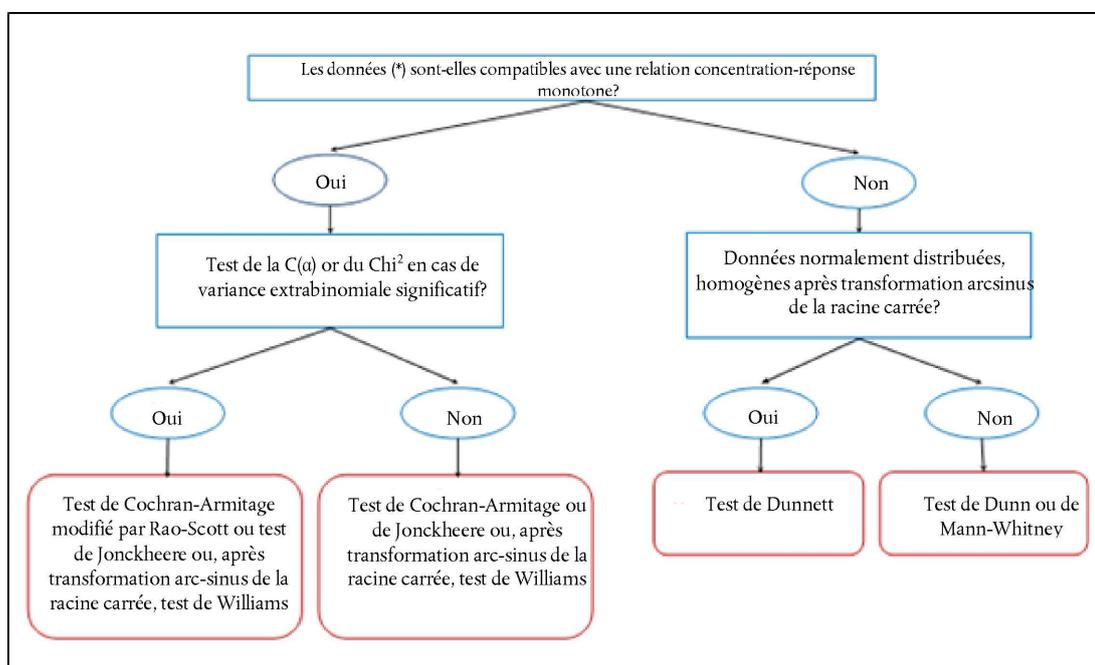
test de la $C(\alpha)$ de Tarone (Tarone, 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

\hat{p} proportion moyenne pour une concentration donnée; m : nombre de réplicats; n_j : nombre de sujets présents dans le réplicat j ; x_j : nombre de sujets répondants dans le réplicat j (non éclos ou morts, par exemple). Ce test est appliqué à chaque concentration séparément. Il peut être considéré comme un test du χ^2 corrigé, mais les simulations de faible puissance effectuées par Tarone ont montré qu'il était plus puissant qu'un test du χ^2 .

Figure 3

Logigramme pour la CSEO –éclosion des œufs et mortalité larvaire



(*) Les données à analyser sont les proportions dans chaque réplicat

En l'absence de preuve significative de la variance extra-binomiale, on peut utiliser le test de Cochran-Armitage. Ce test ne tenant pas compte des réplicats, il est recommandé d'utiliser l'ajustement Rao-Scott du test de Cochran-Armitage (RSCA), qui prend en compte les répétitions, la taille des réplicats et la variance extra-binomiale, s'il existe des preuves de cette dernière. On peut également utiliser le test de Williams, le test de Jonckheere-Terpstra ou le test de Dunnett, tels que décrits pour les observations morphologiques. Ces tests s'appliquent qu'il y ait ou non variance extra-binomiale, mais ont une puissance un peu plus faible (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao et Scott, 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Premier ou dernier jour d'éclosion ou de remontée

La réponse est un nombre entier, indiquant le jour où l'observation indiquée est faite pour un réplicat donné. La plage de valeurs est généralement très limitée, et il y a souvent de fortes proportions de données liées; (par exemple, le premier jour d'éclosion est identique dans tous les témoins et éventuellement pour une ou deux faibles concentrations d'essai). Des tests paramétriques tels que le test de Williams et le test de Dunnett ne conviennent pas pour ce type de données. Sauf preuve sérieuse de non-monotonie, le test de Jonckheere-Terpstra est très puissant pour détecter les effets du produit chimique testé. Sinon, on peut utiliser le test de Dunn.

Malformations larvaires

La réponse est le nombre de larves plus ou moins atteintes de malformations. Cette réponse est souvent de faible incidence et pose certains des mêmes problèmes que le premier jour d'éclosion, avec une relation concentration-réponse parfois erratique. Si les données font apparaître une relation concentration-réponse globalement monotone, le test de Jonckheere-Terpstra est puissant pour détecter les effets. Sinon, on peut utiliser le test de Dunn.

Bibliographie

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OCDE (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Série sur les essais et l'évaluation n° 54*. Organisation de Coopération et de développement économiques, OCDE, Paris.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

Appendice 6

GUIDE D'ORIENTATION POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DES ESTIMATIONS PAR RÉGRESSION

Généralités

Les observations utilisées pour ajuster un modèle sont les moyennes par réplikat (longueur et poids) ou les proportions d'œufs éclos et de larves mortes dans chaque réplikat (OCDE 2006).

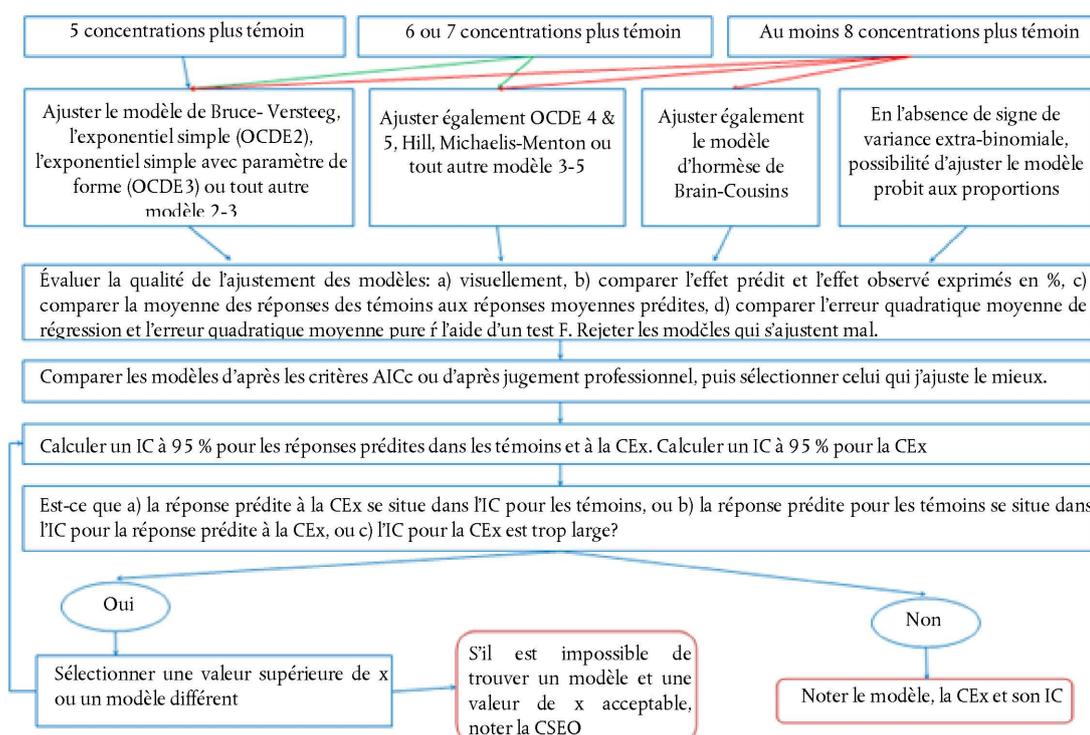
Il est généralement conseillé de procéder à une régression pondérée en utilisant pour ce faire la taille des échantillons réplikat. D'autres systèmes de pondération sont possibles (pondération en fonction de la réponse moyenne prédite ou bien combinaison de ce type de pondération et d'une pondération en fonction de la taille des échantillons réplikat, par exemple). En ce qui concerne les concentrations, la pondération en fonction de l'inverse de la variance dans l'échantillon à une concentration donnée n'est pas recommandée (Bunke *et al.* 1999, Seber et Wild 2003, Motulsky et Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Toute transformation des réponses avant l'analyse doit préserver l'indépendance des observations; la CE_x et les limites de son intervalle de confiance doivent être exprimées dans les unités de mesure d'origine, plutôt que dans les unités transformées. Par exemple, une variation de 20 % du logarithme de la longueur n'équivaut pas à une variation de 20 % de la longueur (Lyles *et al.* 2008, Draper et Smith, 1999).

Le logigramme de la figure 4 donne un aperçu des estimations de la CE_x . Le texte y apporte des explications détaillées.

Figure 4

Logigramme pour l'estimation de la CE_x pour la longueur, le poids, la proportion d'œufs éclos ou la mortalité larvaire moyennes par réplikat; consulter le texte pour de plus amples informations.



Considérations relatives aux éclosions et à la mortalité larvaire

En ce qui concerne les éclosions et la mortalité larvaire, il est généralement préférable d'ajuster un modèle décroissant, à moins d'ajuster un modèle probit comme décrit ci-dessous. Il convient donc de modéliser la proportion d'œufs qui n'éclosent pas ou de larves qui meurent. En effet la CE_x renvoie à une concentration à laquelle la variation est égale à x % de la réponse moyenne des témoins. Si 5 % des œufs témoins ne parviennent pas à éclore et que l'on modélise l'incapacité à éclore, la CE_{20} désigne une concentration à laquelle il se produit une variation égale à 20 % des 5 % d'œufs témoins non éclos, soit une variation de $0,2 * 0,05 = 0,01$ autrement dit d'1 point de pourcentage qui se traduit par un taux d'œufs non éclos de 6 %. Une variation aussi faible ne peut pas être estimée de façon significative à partir des données disponibles et n'est pas biologiquement importante. En revanche, si l'on modélisait la proportion d'œufs qui éclosent, la proportion parmi les témoins serait de 95 % dans notre exemple, et une réduction de 20 % par rapport à la moyenne des réponses des témoins se traduirait par une réduction de $0,95 * 0,2 = 0,19$, soit un taux d'éclosion passant de 95 % à 76 % (= 95 - 19); la concentration produisant cet effet peut être estimée et revêt sans doute un plus grand intérêt. Le problème ne se pose par avec les mesurages se rapportant à la morphologie, bien que les conséquences négatives sur la morphologie correspondent généralement à une diminution de la taille.

Modèles concernant la morphologie (longueur ou poids) et le taux d'éclosion des œufs ou le taux de survie larvaire

Hormis le modèle d'hormèse de Brain-Cousens, tous ces modèles sont décrits et préconisés dans OCDE (2006). Les modèles OCDE 2-5 sont également discutés pour des expériences d'écotoxicité dans Slob (2002). Il existe bien entendu beaucoup d'autres modèles qui pourraient être utiles. Bunke *et al.* (1999) énumère de nombreux modèles ne figurant pas ici, et les références à d'autres modèles sont abondantes. Les modèles énumérés ci-dessous sont jugés particulièrement adaptés aux expériences d'écotoxicité et sont largement utilisés.

Avec 5 concentrations d'essai plus témoin

- Bruce-Versteeg
- exponentiel simple (OCDE 2)
- exponentiel avec paramètre de forme (OCDE 3)
- exponentiel simple avec limite inférieure (OCDE 4)

Avec minimum 6 concentrations d'essai plus témoin

- exponentiel avec paramètre de forme et limite inférieure (OCDE 5)
- Michaelis-Menten
- Hill

Lorsqu'il existe une preuve visuelle de l'hormèse (peu probable en cas de d'éclosion des œufs ou de survie larvaire, mais parfois observée sur le plan morphologique)

- modèle d'hormèse de Brain-Cousens; Brain et Cousens (1989)

Autres modèles pour les œufs non éclos et la mortalité larvaire

- De plus en plus de modèles applicables à ces réponses peuvent être adaptés par des modèles probit (ou logistiques) en l'absence de preuve de variance extra-binomiale; l'incidence du témoin est estimée dans l'ajustement du modèle. Cette méthode n'est pas à privilégier, car elle prend l'individu, et non le réplicat, comme unité d'analyse (Morgan 1992, O'Hara Hines et Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Qualité de l'ajustement d'un modèle unique

- Comparer visuellement la diminution observée et la diminution prédite exprimées en pourcentage à chaque concentration d'essai (Motulsky et Christopoulos 2004, Draper et Smith, 1999).

- Comparer l'erreur quadratique moyenne de régression et l'erreur quadratique moyenne pure à l'aide d'un test F (Draper et Smith, 1999).
- Vérifier que chaque terme du modèle est significativement différent de zéro (autrement dit déterminer si tous les termes du modèle sont importants) (Motulsky et Christopoulos 2004).
- Points de résidus de la régression par rapport à la concentration d'essai, éventuellement sur une échelle log (conc). Il ne doit y avoir aucun modèle pour ce graphique; les points doivent être dispersés au hasard sur une ligne horizontale à la hauteur zéro.
- Les données doivent être évaluées du point de vue de la normalité et de l'homogénéité de la variance comme indiqué à l'appendice 5.
- En outre, la normalité des résidus du modèle de régression doit être évaluée selon les mêmes méthodes indiquées à l'appendice 5 pour les résidus de l'ANOVA.

Comparaison des modèles

- Utiliser les critères AICc d'Akiake. Des valeurs AICc plus petites traduisent un meilleur ajustement, et si $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, le modèle A est presque certainement meilleur que le modèle B (Motulsky et Christopoulos 2004).
- Comparer visuellement les deux modèles pour voir comment ils répondent aux critères du modèle unique ci-dessus.
- Le principe de parcimonie est conseillé, principe selon lequel on utilise le modèle le plus simple qui ajuste raisonnablement bien les données (Ratkowsky 1993, Lyles *et al.* 2008).

Qualité de l'estimation de la CE_x

L'intervalle de confiance (IC) de la CE_x ne doit pas être trop large. Le jugement statistique est nécessaire pour décider de la largeur de l'intervalle de confiance et de l'utilité que peut encore avoir la CE_x . Les simulations de modèles de régression ajustés aux données relatives à l'éclosion des œufs et aux données morphologiques montrent que 75 % environ des intervalles de confiance pour la CE_x ($x = 10, 20$ ou 30) ne portent pas sur plus de deux concentrations d'essai. Cela donne une idée de ce qui est acceptable et réalisable. De nombreux auteurs affirment qu'il faut indiquer les intervalles de confiance pour tous les paramètres du modèle et que lorsque les intervalles de confiance des paramètres du modèle sont grands, cela signifie que les modèles sont inacceptables (Ott et Longnecker 2008, Alvord et Rossio 1993, Motulsky et Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber et Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environnement Canada, 2005).

L'intervalle de confiance de la CE_x (ou de tout autre paramètre du modèle) ne doit pas contenir zéro (Motulsky et Christopoulos 2004). Il s'agit de la régression équivalente à la différence significative minimale qui est souvent citée dans les méthodes de vérification des hypothèses (Wang *et al.* 2000, par exemple). Il correspond également à l'intervalle de confiance pour que les réponses moyennes à la CME0 ne contiennent par la moyenne des réponses des témoins. Les estimations des paramètres sont-elles scientifiquement plausibles ? Par exemple, si l'intervalle de confiance pour y_0 est $\pm 20\%$, aucune estimation de la CE_{10} n'est plausible. Si le modèle prédit un effet de 20% à une concentration C et si l'effet maximal observé à la concentration C et aux concentrations en-deçà est de 10% , alors la CE_{20} n'est pas plausible (Motulsky et Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environnement Canada, 2005).

La CE_x ne doit pas être extrapolée en dehors de la plage de concentrations positives (Draper et Smith 1999, OCDE 2006). Par exemple, un guide général pourrait être que la CE_x ne doit pas être inférieure de plus de 25% environ à la concentration d'essai la plus faible ou supérieure de plus de 25% à la concentration d'essai la plus élevée.

BIBLIOGRAPHIE

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, 2nde édition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, 2nde édition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environnement Canada (2005), Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité, SPE1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. Novembre 2008; 29(6): 878-886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); *Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time*, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OCDE (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 54, pp. 1-147, [ENV/JM/MONO\(2006\)18](#), OCDE, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 6^{ème} édition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113-117, 2000.

C.48 Essai à court terme de reproduction des poissons

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 229 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le développement et la validation d'un essai sur les poissons, capable de détecter des produits chimiques agissant sur le système endocrinien, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes suscitées par la présence dans l'environnement de produits chimiques à des concentrations susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'homme et la faune sauvage. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les Lignes directrices existantes et à élaborer de nouvelles Lignes directrices concernant le dépistage et l'essai d'éventuels perturbateurs endocriniens. L'un des volets de cette activité consistait à élaborer une ligne directrice pour le dépistage des produits chimiques agissant sur le système endocrinien des poissons. L'essai à court terme de reproduction des poissons a fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant des études inter-laboratoires portant sur une série de substances et visant à démontrer la pertinence et la fiabilité de l'essai pour la détection des produits chimiques affectant la reproduction chez les poissons par différents mécanismes, y compris des mécanismes endocriniens (1, 2, 3, 4, 5). La ligne directrice de l'OCDE découle des travaux de validation effectués sur le tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Certaines observations mesurées ont également été validées sur le medaka japonais (*Oryzias latipes*) pour ce qui concerne la mesure de la vitellogénine et les caractères sexuels secondaires, et chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) en ce qui concerne la mesure de la vitellogénine. Ces travaux de validation ont été en partie revus par un comité composé d'experts désignés par les Coordinateurs nationaux du Programme sur les lignes directrices de l'OCDE (6), et aussi par un groupe d'experts indépendants commissionnés par l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (29). Cet essai n'est pas conçu pour identifier les mécanismes spécifiques du dérèglement hormonal dans la mesure où les animaux d'essai possèdent un axe hypothalamo-hypophyséogonadique (HHG) intact et sont en mesure de réagir aux produits chimiques ayant des effets sur l'axe HHG à différents niveaux.
2. La présente méthode d'essai décrit un essai de dépistage *in vivo* sur des groupes de poissons (composés de mâles sexuellement matures et de femelles reproductrices) exposés à une substance pendant une durée limitée de leur cycle biologique (21 jours). À l'issue de cette période d'exposition de 21 jours, deux biomarqueurs sont mesurés chez les mâles et les femelles pour servir d'indicateurs des effets de la substance d'essai sur le système endocrinien; ces biomarqueurs sont la vitellogénine (VTG) et les caractères sexuels secondaires. La vitellogénine est dosée chez le tête-de-boule, le medaka japonais et le poisson-zèbre tandis que les caractères sexuels secondaires sont mesurés chez le tête-de-boule et le medaka japonais. Pendant toute la durée de l'essai, la fécondité est en outre évaluée quotidiennement sur le plan quantitatif. Les gonades sont préservées et l'histopathologie gonadique peut être utilisée pour évaluer l'adaptation du système reproducteur des animaux testés et pour confirmer les éléments de preuve apportés par les autres biomarqueurs.
3. Ce bio-essai sert d'essai de dépistage *in vivo*, et son application est envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens» (30). Dans ce cadre conceptuel, l'essai de reproduction sur les poissons est proposé au niveau 3, en tant qu'essai *in vivo* fournissant des données sur certains mécanismes/certaines voies endocriniennes.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La vitellogénine (VTG) est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes. Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La vitellogénine est quasiment indétectable dans le plasma des poissons mâles et femelles immatures, et ce en raison d'une présence insuffisante d'œstrogènes circulants; néanmoins, le foie peut synthétiser et sécréter la vitellogénine en réponse à une stimulation œstrogénique exogène.
5. Le dosage de la vitellogénine sert à détecter les produits chimiques ayant une action (anti-)œstrogénique. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de vitellogénine chez les poissons mâles; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture (7, par exemple). L'induction de vitellogénine a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (8, 9). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17 β -œstradiol), engendre une diminution du niveau de vitellogénine utilisée pour détecter les inhibiteurs d'aromatase (10, 11). La pertinence biologique de la réponse donnée par la vitellogénine suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée. Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non-endocriniens (hépatotoxicité, par exemple).

6. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine. Ainsi, le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un principe de reconnaissance immunologique couplé à une réaction enzymatique permettant de doser la vitellogénine à partir de prélèvements sanguins ou hépatiques effectués sur des poissons (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Les échantillons sont prélevés sur trois espèces: le tête-de-boule (sang), le poisson-zèbre (sang ou homogénat tête/queue) et le medaka (foie). Chez le medaka, il existe une bonne corrélation entre la concentration sanguine et la concentration hépatique de VTG (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine sont décrites à l'appendice 6. Des kits de dosage de la vitellogénine sont largement disponibles; ils sont fondés sur une méthode ELISA validée et spécifique de l'espèce testée.
7. Les caractères sexuels secondaires des poissons mâles de certaines espèces sont visibles à l'œil nu, quantifiables et réactifs aux taux d'androgènes endogènes circulants; c'est le cas pour le tête-de-boule et le medaka mais pas pour le poisson-zèbre, qui ne possède pas de caractères sexuels secondaires quantifiables. Les femelles conservent la capacité de développer des caractères sexuels secondaires masculins en cas d'exposition à des produits chimiques androgènes présents dans l'eau. Un certain nombre d'études scientifiques traitent de ce type de réponse chez le tête-de-boule (20) et le medaka (21). La dégénérescence des caractères sexuels secondaires chez les mâles est interprétée avec prudence en raison de leur faible puissance statistique. Par ailleurs, toute interprétation en la matière est fondée sur un jugement expert et sur l'analyse du poids de la preuve. L'utilisation du poisson-zèbre pour cet essai a ses limites compte tenu de l'absence, chez cette espèce, de caractères sexuels secondaires quantifiables, réactifs aux produits chimiques agissant sur les androgènes.
8. Chez le tête-de-boule, le nombre de tubercules nuptiaux situés sur le museau des femelles constitue le principal indicateur d'exposition à des androgènes exogènes. Chez le medaka femelle, le nombre de tubercules papillaires constitue le principal indicateur d'exposition à des produits chimiques androgènes. Les recommandations sur les procédures à suivre pour évaluer les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'appendice 5A et à l'appendice 5B.
9. L'essai de 21 jours sur les poissons permet aussi de mesurer de manière deux autres paramètres, à savoir la quantité d'œufs produite et, optionnellement, l'histopathologie gonadique. Certaines autorités réglementaires peuvent exiger l'histopathologie gonadique pour une évaluation plus complète de l'adaptation du système reproducteur des animaux d'expérience, ou dans les cas où la vitellogénine et les caractères sexuels secondaires n'ont pas répondu à l'exposition aux substances chimiques. Bien que certaines observations aient une valeur diagnostique élevée (p. exemple l'induction de la vitellogénine chez les poissons mâles ou la formation de tubercules chez les poissons femelles), toutes les observations rapportées de l'essai (p. exemple la fécondité ou l'histopathologie des gonades n'ont pas pour fonction d'identifier de manière non équivoque un mécanisme d'action cellulaire spécifique. Au contraire, la série d'observations de l'essai permet globalement de faire des déductions quant aux possibles perturbations endocriniennes, et donc d'orienter des tests à plus long terme. Malgré sa non-spécificité, la mesure de la fécondité est une observation importante dans l'essai étant donné la sensibilité démontrée vis-à-vis des produits chimiques actifs sur le système endocrinien (5). De plus, si la mesure de la fécondité, ainsi que les autres observations de l'essai ne sont pas affectées, il est plus aisé de conclure que la substance n'est probablement pas active sur le système endocrinien. Cependant le poids des preuves dans l'établissement des conclusions sera influencé si la mesure de la fécondité est affectée. Des orientations pour l'interprétation des données et l'acceptation des résultats d'essai seront données dans la suite de la présente méthode d'essai.
10. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Lors de l'essai, des poissons mâles et femelles en état de se reproduire sont placés ensemble dans des récipients d'essai où ils sont exposés à des substances chimiques. Leur état d'adultes reproducteurs permet une différenciation claire entre les deux sexes, et donc une analyse des effets mesurés en fonction du sexe; il garantit également leur sensibilité aux substances exogènes. A la fin de l'essai, le sexe est confirmé par un examen macroscopique des gonades après incision de l'abdomen avec des ciseaux. Un tableau récapitulatif des conditions expérimentales pertinentes figure à l'appendice 2. Pour cet essai on sélectionne normalement des

poissons en état de frayer; les animaux sénescents sont écartés. La section relative à la *sélection des poissons* donne des indications sur l'âge des poissons et sur leur état reproducteur. Trois concentrations d'essai ainsi qu'une cuve témoin contenant de l'eau sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Deux cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve contenant 5 mâles et 5 femelles) pour le poisson-zèbre; quatre récipients ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque récipient comprenant 2 mâles et 4 femelles) pour le tête-de-boule. Ce principe permet de tenir compte du comportement territorial des têtes-de-boule mâles tout en maintenant la puissance de l'essai à un niveau suffisant. Quatre récipients ou répliquats par traitement sont utilisés pour médaka (chaque récipient contenant 3 mâles et 3 femelles). La durée d'exposition est de 21 jours; le prélèvement des poissons est effectué le 21^e jour. La fécondité est contrôlée quotidiennement sur le plan quantitatif.

12. Le 21^e jour, tous les poissons sont euthanasiés. Les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du médaka sont évalués (cf. appendices 5A et 5B); des prélèvements sanguins sont effectués pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre et le tête-de-boule, mais un homogénat tête/queue peut aussi être utilisé pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre (appendice 6); des prélèvements hépatiques sont effectués pour le dosage de la VTG chez le médaka (appendice 6); les gonades sont fixées *in situ* ou bien disséquées pour une évaluation histopathologique éventuelle (22).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

13. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions suivantes s'appliquent:

- La mortalité dans les récipients témoins (eau ou solvant) ne dépasse pas 10 pour cent à la fin de la période d'exposition;
- La concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 pour cent au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) durant toute la période d'exposition;
- À aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère pas de plus de $\pm 1,5$ °C entre les récipients, et elle demeure à l'intérieur d'un intervalle de 2°C compris dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (appendice 2);
- Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées;
- Les données disponibles démontrent que les poissons se reproduisent activement dans tous les répliquats avant le début de l'exposition et dans les répliquats témoins pendant la durée de l'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:
- a. un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;
 - b. un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;
 - c. un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;
 - d. des récipients en matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir appendice 2);
 - e. un substrat de frai pour les têtes-de-boule et les poissons-zèbres (voir appendice 4);
 - f. une balance suffisamment précise (précision de $\pm 0,5$ mg).

Eau

15. On utilise une eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. Le pH de l'eau est compris entre 6,5 et 8,5 sans varier de plus de $\pm 0,5$ unité de pH au cours d'un même essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne modifiera pas le résultat de l'essai (notamment par complexation du produit chimique d'essai), on prélève des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), des pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, etc.), du carbone organique total et des solides en suspension est effectué tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est révélée constante durant au moins un an, on peut espacer les mesures (tous les six mois, par exemple). Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 3.

Solutions d'essai

16. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un solvant véhicule n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il convient de réaliser en parallèle un témoin contenant la même concentration de solvant que les solutions d'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, il convient de consulter le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (23). Le choix du solvant est déterminé par les propriétés chimiques de la substance ou du mélange. Le document d'orientation de l'OCDE recommande de ne pas dépasser une concentration maximale de 100 µl/l. Toutefois une étude récente (24) a montré que l'utilisation de solvants lors des essais de substances ayant des effets sur le système endocrinien pouvait poser d'autres problèmes. Si l'utilisation d'un solvant s'avère nécessaire, il est donc recommandé de réduire sa concentration à un minimum dans toute la mesure des possibilités techniques (qui dépendent des propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai).
17. On utilise un essai dynamique requérant un système qui délivre et dilue en continu une solution mère du produit chimique d'essai (pompe doseuse, dilueur proportionnel, système de saturation, par exemple) pour appliquer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Le débit des solutions mères et de l'eau de dilution est vérifié périodiquement, de préférence tous les jours, pendant la durée de l'essai et ne varie pas de plus de 10 % durant l'essai. Il convient de veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique de mauvaise qualité ou autres matériaux pouvant contenir des produits chimiques biologiquement actifs. Pour la sélection du matériel pour l'essai dynamique, il convient de prendre en considération l'adsorption possible du produit chimique d'essai sur le matériel.

Maintenance des poissons

18. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire, issue de préférence d'une même lignée, qui a été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage similaires à celles de l'essai. Il importe que le taux de charge et la densité de peuplement (voir les définitions à l'appendice 1) soient adaptés à l'espèce testée (voir appendice 2).
19. Après une période d'acclimatation de 48 heures, on note les mortalités et on applique les critères suivants:
 - mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté;
 - mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: la période d'acclimatation est prolongée de sept jours; si la mortalité dépasse 5 % durant la deuxième période de 7 jours, le lot entier est rejeté;
 - mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.
20. Les poissons ne reçoivent pas de traitement pour maladie durant les périodes d'acclimatation, de pré-exposition et d'exposition.

Pré-exposition et sélection des poissons

21. Pendant la période de pré-exposition (une à deux semaines), les poissons sont placés dans des récipients similaires à ceux de l'essai. Il est préférable de nourrir les poissons *ad libitum* durant toute la période d'acclimatation et d'exposition. La période d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphes issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures (présentant, par exemple, des caractères sexuels secondaires visibles à l'œil nu en ce qui concerne le tête-de-boule et le medaka), se reproduisant activement. A titre d'orientation générale (ne devant pas être prise en considération indépendamment de l'observation de l'état reproducteur du lot entier), il convient que le poisson tête-de-boule soit âgé d'environ 20 (\pm 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant son élevage; que le medaka japonais soit âgé d'environ 16 (\pm 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant son élevage; et que le poisson-zèbre soit âgé d'environ 16 (\pm 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant son élevage. La fécondité est évaluée tous les jours durant toute la période de pré-exposition. Il est recommandé de mesurer et noter la fécondité dans tous les répliquats avant de commencer la phase d'exposition de l'essai en elle-même. Des instructions sur le nombre d'œufs produits quotidiennement ne peuvent pas être fournies à ce stade, mais il n'est pas rare d'avoir en moyenne .10 œufs/femelle/jour pour chaque espèce. Un dispositif d'essai permettant de disposer au hasard les répliquats en fonction des productions d'œufs pour les différents traitements sera préférée afin d'assurer une distribution équilibrée des répliquats.

CONCEPTION DE L'ESSAI

22. Trois concentrations du produit chimique d'essai ainsi qu'un témoin (contenant de l'eau) sont utilisés. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Les données peuvent faire l'objet d'analyses statistiques permettant de déceler les différences significatives entre les réponses correspondant à chaque niveau de concentration et au témoin. Plutôt que de servir à l'évaluation des risques, ces analyses sont utiles pour déterminer si le produit chimique doit faire l'objet de tests afin d'évaluer ses éventuels effets néfastes à plus long terme (survie, développement, croissance et reproduction) (25).
23. Pour le poisson-zèbre, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des deux répliquats comprenant 5 mâles et 5 femelles) et dans les témoins en vue du dosage de la vitellogénine. Pour le médaka, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 3 mâles et 3 femelles) et dans les témoins en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires. Pour les têtes-de-boule, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 2 mâles et 4 femelles) et dans les témoins en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires. L'évaluation quantitative de la fécondité est requise, et les tissus gonadiques sont fixés en entier ou disséqués pour une évaluation histopathologique éventuelle, s'il y a lieu.

Sélection des concentrations d'essai

24. Pour les besoins de l'essai, la concentration la plus forte est déterminée en fonction de la concentration maximale tolérée (CMT) obtenue à partir d'un essai préliminaire ou à partir d'autres données de toxicité, ou est fixée à 10 mg/l, ou encore est déterminée en fonction de la solubilité maximale dans l'eau, selon la valeur qui est la plus basse. La CMT est définie comme la concentration d'essai maximale de la substance engendrant un taux de mortalité inférieur à 10 %. L'utilisation de cette approche suppose l'existence de données empiriques sur la toxicité aiguë ou d'autres données de toxicité à partir desquelles la CMT pourra être estimée. L'estimation de la CMT peut être inexacte et requiert généralement un jugement expert.
25. Trois concentrations d'essai, espacées par un facteur constant ne dépassant pas 10, et un témoin contenant l'eau de dilution (plus, si nécessaire, un témoin solvant) sont nécessaires. Une gamme de facteurs d'espacement compris entre 3,2 et 10 est recommandée.

MODE OPÉRATOIRE

Sélection et pesée des poissons d'essai

26. Il importe de veiller à ce que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. L'appendice 2 indique les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Au début de l'essai, il convient si possible que la gamme des poids de l'ensemble des poissons mâles et femelles du lot utilisé ne sorte pas d'un intervalle de $\pm 20\%$ autour de la moyenne arithmétique de chaque sexe. On recommande de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

Conditions d'exposition*Durée*

27. La durée de l'essai est de 21 jours, après une période de pré-exposition. La durée de pré-exposition recommandée est de une à deux semaines.

Alimentation

28. Les poissons reçoivent *ad libitum* une nourriture appropriée (appendice 2) en quantité suffisante pour maintenir leur condition physique. Il convient de veiller à prévenir la prolifération de micro-organismes et la turbidité de l'eau. A titre d'indication générale, la ration quotidienne peut être divisée en deux ou trois parts égales administrées à trois heures d'intervalle au moins. Une seule ration plus conséquente est acceptable, notamment le week-end. Les poissons sont privés de nourriture pendant les 12 heures qui précèdent les prélèvements/l'autopsie.
29. Le dosage des contaminants [pesticides organochlorés, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), biphényles polychlorés (PCB)] est effectué dans la nourriture. Il convient d'éviter une nourriture présentant une forte concentration de phytoestrogènes qui compromettraient la réponse de l'essai à un agoniste œstrogénique connu (17 β -œstradiol, par exemple).
30. Les aliments non consommés et les matières fécales sont retirés des récipients d'essai au moins deux fois par semaine, par un nettoyage soigneux du fond de chaque récipient d'essai à l'aide d'un siphon, par exemple.

Lumière et température

31. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir appendice 2).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

32. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution de la substance est vérifié. Toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies, y compris des connaissances suffisantes sur la stabilité du produit chimique dans le système d'essai. Pendant l'essai, les concentrations du produit chimique d'essai sont déterminées à intervalles réguliers, en vérifiant de préférence chaque jour, mais à défaut au moins deux fois par semaine, le débit du diluant et celui de la solution mère de substance toxique. Il convient que ces débits ne varient pas de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Il est recommandé de mesurer les concentrations du produit chimique d'essai dans chaque récipient au début de l'essai puis chaque semaine.
33. Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

34. Il peut s'avérer utile de filtrer les échantillons (avec des pores de 0,45 µm, par exemple) ou de les centrifuger. Si elle est nécessaire, la centrifugation est la procédure recommandée. Cependant, si le matériel d'essai ne s'adsorbe pas sur le filtre, la filtration est également acceptable.
35. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, la température et le pH sont mesurés dans tous les récipients d'essai au moins une fois par semaine. La dureté totale et l'alcalinité sont mesurées au moins une fois par semaine dans les récipients témoins et dans un récipient contenant la concentration la plus forte. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins un récipient d'essai.

Observations

36. Un certain nombre de réponses biologiques générales (survie, par exemple) et ciblées par l'essai (niveaux de VTG, par exemple) sont évaluées au cours ou à la fin de l'essai. Le contrôle quantitatif de la fécondité peut être effectué quotidiennement si cela est requis par l'autorité réglementaire. La mesure et l'évaluation de ces biomarqueurs ainsi que leur utilité sont décrits dans la suite de la présente méthode d'essai.

Survie

37. Il convient d'examiner les poissons quotidiennement durant l'essai. Les décès sont notés et les poissons morts retirés dès que possible. Les poissons morts ne sont pas remplacés dans les récipients témoins ou les récipients contenant la substance. Le sexe des poissons morts durant l'essai est déterminé par observation macroscopique des gonades.

Comportement et apparence

38. Tout comportement anormal (par rapport aux témoins) est noté, car il peut être un signe de toxicité générale (hyperventilation, nage non coordonnée, perte d'équilibre, immobilité ou alimentation atypiques). Il convient en outre de relever les éventuelles anomalies externes (hémorragie, décoloration, par exemple). La prudence s'impose lors de l'interprétation de ces signes de toxicité dans la mesure où ceux-ci peuvent révéler des concentrations auxquelles les biomarqueurs d'effets potentiels sur le système endocrinien ne sont pas fiables. Ces observations sur le comportement peuvent aussi fournir des informations qualitatives utiles pour les futures exigences potentielles en matière d'essais sur les poissons. On a ainsi pu observer une agressivité territoriale chez les têtes-de-boule mâles normaux ou chez les têtes-de-boule femelles masculinisées en cas d'exposition à des androgènes. Le comportement caractéristique d'accouplement et de reproduction du poisson-zèbre après les premières lueurs de l'aube est réduit ou entravé par l'exposition aux œstrogènes ou aux anti-androgènes.
39. La manipulation des poissons pouvant engendrer une modification rapide de certaines caractéristiques physiques (notamment la couleur), il importe de procéder aux observations qualitatives avant le retrait des poissons du système expérimental. Les expériences menées jusqu'à présent sur le tête-de-boule donnent à penser que certains perturbateurs endocriniens peuvent d'emblée avoir des effets sur les caractéristiques physiques suivantes: couleur (claire ou sombre), motifs de coloration (présence de bandes verticales) et forme du corps (région de la tête et région pectorale). Les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées au cours et à la fin de l'essai.

Fécondité

40. Des observations quantitatives quotidiennes relatives au frai seront consignées pour chaque répliquat. On notera la fécondité, à savoir le nombre d'œufs/femelle survivante/jour pour chaque répliquat. Les œufs seront retirés chaque jour des enceintes d'essai. Les substrats de frai sont placés dans l'enceinte d'essai pour le tête-de-boule et le poisson-zèbre, afin de permettre aux poissons de frayer normalement. On trouvera à l'appendice 4 des recommandations sur les substrats de frai pour les poissons-zèbres (appendice 4A) et les têtes-de-boule (appendice 4A). L'utilisation d'un substrat de frai pour le medaka n'est pas jugée utile.

Euthanasie des poissons

41. Le 21^{ème} jour, c'est-à-dire à la fin de la période d'exposition, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités de tricaine appropriées [solution de 100-500 mg/l de méthanesulphonate de tricaine (MS 222) (CAS.886-86-2) tamponnée avec 300 mg/l de NaHCO₃ (bicarbonate de sodium, CAS.144-55-8)] destinées à réduire l'irritation de la muqueuse; des prélèvements de sang et de tissus sont ensuite effectués pour le dosage de la VTG (voir la section sur la vitellogénine).

Observation des caractères sexuels secondaires

42. Certains perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets sur des caractères sexuels secondaires spécialisés (nombre de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule mâle et de tubercules papillaires chez le medaka mâle). Certaines substances peuvent notamment engendrer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez les animaux du sexe opposé. Ainsi les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que le trenbolone, la méthyltestostérone et la dihydrotestostérone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux proéminents chez le tête-de-boule femelle et celle de tubercules papillaires chez le medaka femelle (20, 11, 21). On a pu noter également que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre de tubercules nuptiaux et la taille de l'amas graisseux situé sur la tête des adultes mâles pour l'espèce tête-de-boule (26, 27). Ces observations morphologiques macroscopiques peuvent fournir des informations qualitatives et quantitatives utiles pour fonder d'éventuelles exigences futures en matière d'essais sur les poissons. Le nombre et la taille des tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule ainsi que ceux des tubercules papillaires chez le medaka peuvent être quantifiés directement, ou de manière plus pratique sur des spécimens préservés. Les recommandations sur les procédures applicables pour l'évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'appendice 5A et à l'appendice 5B.

Vitellogénine (VTG)

43. Un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhémato-crite héparinisé ou par ponction cardiaque avec une seringue. Selon la taille du poisson, les volumes sanguins prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu pour les têtes-de-boule et de 5 à 15 µl par individu pour les poissons-zèbres. Le plasma est séparé du sang par centrifugation avant d'être stocké avec des inhibiteurs de protéase à - 80°C jusqu'à son analyse pour le dosage de la VTG. Chez le medaka, un prélèvement hépatique est utilisé; chez le poisson-zèbre, un homogénat tête/queue peut être utilisé comme échantillon tissulaire pour le dosage de la VTG (appendice 6). Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode ELISA homologue validée en utilisant des anticorps homologues et un standard de VTG homologue. Il est recommandé d'utiliser une méthode capable de détecter des concentrations de VTG de quelques ng/ml de plasma (ou ng/mg de tissus) seulement, correspondant à la concentration de fond chez les poissons mâles non exposés.
44. Le contrôle qualité de l'analyse de la VTG se fait par le biais de solutions-étalons, de blancs et, au minimum, d'analyses dédoublées. Pour chaque méthode ELISA, l'effet de matrice (effet de la dilution de l'échantillon) est testé afin de déterminer le facteur de dilution minimale de l'échantillon. Chaque plaque ELISA utilisée pour le dosage de la VTG comporte les échantillons de contrôle qualité suivants: au moins six solutions-étalons couvrant la plage des concentrations attendues de VTG, et au moins un blanc d'essai de liaison non spécifique (en analyse dédoublée). L'absorbance de ces blancs est inférieure à 5 % de l'absorbance maximale des solutions-étalons. Au moins deux aliquotes (puits dédoublés) de chaque dilution de l'échantillon sont analysés. Les puits dédoublés qui diffèrent de plus de 20 % font l'objet d'une nouvelle analyse.
45. Le coefficient de corrélation (R^2) des courbes d'étalonnage est supérieur à 0.99. Toutefois une corrélation élevée ne suffit pas à garantir la prédiction adéquate de la concentration pour toutes les plages de concentration. En plus d'obtenir une corrélation suffisamment élevée pour la courbe d'étalonnage, la concentration de chaque solution-étalon, calculée à partir de la courbe d'étalonnage, est comprise entre 70 et 120 % de sa concentration nominale. Si les concentrations nominales ont tendance à s'éloigner de la droite de régression de l'étalonnage (à des concentrations plus faibles, par exemple), il peut s'avérer nécessaire de partager la courbe d'étalonnage en deux plages, l'une forte et l'autre faible, ou d'utiliser un modèle non linéaire pour ajuster correctement les données relatives à l'absorbance. Si la courbe est partagée, il convient que les deux segments de droite aient un coefficient de corrélation $R^2 > 0.99$.
46. La limite de détection (LD) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, et la limite de quantification (LDQ) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, multipliée par le facteur de dilution le plus faible.
47. Chaque jour où des essais portant sur la VTG sont réalisés, un échantillon supplémenté obtenu à partir d'un étalon de référence inter-essais sera analysé (appendice 7). On notera alors systématiquement le rapport entre la concentration attendue et la concentration mesurée avec les résultats de chaque série d'essais effectuée ce jour-là.

Évaluation de l'histopathologie gonadique

48. L'histopathologie gonadique peut être demandée par les autorités réglementaires pour étudier l'organe récepteur de l'axe HHG après exposition à des substances chimiques. A ce propos, il est recommandé de fixer les gonades *in situ* ou bien de les disséquer. En cas de demande d'histopathologie, les réponses spécifiques du système endocrinien sur les gonades seront recherchées lors de l'évaluation des effets potentiels du produit chimique d'essai sur le système endocrinien. Ces réponses diagnostiques comprennent essentiellement la présence d'ovocytes testiculaires, une hyperplasie des cellules de Leydig, une diminution de la formation de vitellus, une augmentation de la spermatogonie et une hyperplasie perifolliculaire. D'autres lésions gonadiques comme une atrophie des ovocytes, une dégénérescence testiculaire et des changements de stade peuvent avoir diverses causes. Le document d'orientation sur l'histopathologie gonadique des poissons précise les procédures qui seront utilisées pour la dissection, la fixation, la coupe et l'évaluation histopathologique des gonades (22).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation de la réponse des biomarqueurs par l'analyse de la variance (ANOVA)

49. Pour identifier les effets potentiels d'une substance sur le système endocrinien, on compare les réponses des groupes traités et des groupes témoins en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Si un témoin contenant un solvant est utilisé, une analyse statistique appropriée du témoin contenant l'eau de dilution et du témoin contenant le solvant est effectuée pour chaque effet observé. On trouvera dans le document de l'OCDE de 2006 sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (28) des orientations sur le traitement des données relatives au témoin contenant l'eau de dilution et au témoin contenant le solvant lors de l'analyse statistique ultérieure. Les réponses biologiques obtenues sont analysées et notées séparément pour chaque sexe. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne se vérifient pas — distribution non normale (par exemple test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett ou de Levene) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de réaliser l'ANOVA ou de conduire une analyse pondérée de la variance. Le test de Dunnett (paramétrique) permettant de multiples comparaisons par paires ou le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni (non paramétrique) peuvent être utilisés pour une relation dose-réponse non monotone. D'autres tests statistiques peuvent être utilisés (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) si la relation dose-réponse est approximativement monotone. Un ordinogramme d'analyse statistique figure à l'appendice 8. Cet outil d'aide à la décision permet de choisir le test statistique le plus approprié. Le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (28) fournit d'autres informations en la matière.

Rapport d'essai

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

Installation d'essai:

- Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun
- Chaque laboratoire a démontré sa compétence sur une gamme de substances chimiques représentatives

Produit chimique d'essai:

- Caractérisation du produit chimique d'essai
- Nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes
- Méthode et fréquence de préparation des concentrations d'essai
- Informations sur la stabilité et la biodégradabilité

Solvant:

- Caractérisation du solvant (nature, concentration utilisée)
- Justification du choix du solvant (si autre que l'eau)

Animaux d'essai:

- Espèce et souche
- Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur
- Âge des poissons au début de l'essai et état reproducteur
- Informations détaillées sur la procédure d'acclimatation des animaux
- Poids corporel des poissons au début de l'exposition (déterminé à partir d'un sous-échantillon issu de la population de poissons)

Conditions de l'essai:

- Méthode utilisée (type d'essai, taux de charge, densité de peuplement, etc.);
- Méthode de préparation des solutions mères et débit;
- Concentrations d'essai nominales, dosage hebdomadaire de la concentration des solutions d'essai et méthode analytique utilisée, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique d'essai en solution vraie;
- Caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, alcalinité, température, concentration d'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore, carbone organique total, solides en suspension et toute autre mesure effectuée);
- Qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;
- Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple).

Résultats

- Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité de l'essai;
- Données sur la mortalité pour chaque concentration d'essai et chaque témoin;
- Techniques d'analyse statistique appliquées, traitement des données et justification des méthodes utilisées;
- Données sur les observations biologiques de morphologie macroscopique, y compris les caractères sexuels secondaires, la fécondité et la VTG;
- Résultats des analyses de données, de préférence sous forme de tableaux et de graphiques;
- Fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par le produit chimique d'essai

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS DE L'ESSAI

51. Cette partie traite des paramètres à prendre en compte pour l'interprétation des résultats de l'essai en ce qui concerne les différents effets mesurés. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque le produit chimique d'essai semble provoquer des signes de toxicité manifestes ou avoir des effets sur l'état général de l'animal d'expérience.
52. Lors de la détermination préliminaire des concentrations d'essai, on veillera à ne pas dépasser la concentration maximale tolérée pour pouvoir interpréter les données de façon fiable. Il importe d'appliquer au moins un traitement qui ne provoque aucun signe d'effets toxiques. Les symptômes de maladie et les signes d'effets toxiques font l'objet d'une évaluation et d'un rapport détaillés. Il est possible, par exemple, que la production de VTG chez les femelles soit également affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non liés au système endocrinien (hépatotoxicité, par exemple). Toutefois l'interprétation des effets peut être renforcée par d'autres niveaux de traitement dont les effets ne sont pas perturbés par la toxicité systémique.

53. Quelques paramètres sont pris en compte pour l'acceptation des résultats de l'essai. A titre indicatif, les niveaux de VTG sont distincts chez les mâles et les femelles témoins, et séparés d'au moins trois ordres de grandeur chez le tête-de-boule et le poisson-zèbre et d'un ordre de grandeur chez le medaka. Des exemples de la gamme des valeurs relevées dans les groupes témoins et les groupes traités sont disponibles dans les rapports de validation (1, 2, 3, 4). Des valeurs élevées de VTG chez les mâles des groupes témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogènes de faible puissance. Des valeurs de VTG basses chez les femelles témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des inhibiteurs de l'aromatase et des antagonistes des œstrogènes. Les études de validation ont été utilisées pour la rédaction de ces orientations.
54. La quantification du nombre d'œufs produits est sujette à d'importantes variations [le coefficient de variation (CV) peut être compris entre 20 et 60 %] qui peuvent avoir une incidence sur la capacité de l'essai à détecter une baisse significative de la production d'œufs inférieure à 70 % à mesure que le CV se rapproche de 50 % ou plus. Lorsque le CV est limité à des valeurs inférieures (de 20-30 %), l'essai aura une puissance statistique acceptable (80 %) pour détecter une baisse de 40-50 % de la production d'œufs. Le protocole d'essai utilisé pour le tête-de-boule, comprenant quatre répliquats par niveau de concentration, devrait conférer plus de puissance au critère de fécondité qu'un protocole comprenant seulement deux répliquats.
55. Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, par exemple), il est conseillé de faire un essai pour vérifier la compétence technique. Il est recommandé d'utiliser des produits chimiques représentant une gamme de modes d'action ou d'impacts sur certains des paramètres mesurés durant l'essai. En pratique, chaque laboratoire est encouragé à constituer ses propres données de historiques témoins pour les mâles et les femelles, et à faire un essai avec un témoin positif de l'activité œstrogénique (par exemple, 17 β -œstradiol à 100 ng/l, ou un agoniste faible connu) engendrant une augmentation de la VTG chez les mâles, un témoin positif de l'inhibition de l'aromatase (fadrozole ou prochloraze à 300 μ g/l, par exemple) engendrant une diminution de la VTG chez les femelles, et un témoin positif de l'activité androgénique (17 β -trenbolone à 5 μ g/l, par exemple) engendrant l'induction de caractères sexuels secondaires chez les femelles tête-de-boule et medaka. Toutes ces données peuvent être comparées aux données disponibles issues des études de validation (1, 2, 3) pour garantir la compétence du laboratoire.
56. En général, les mesures de la VTG sont considérées comme positives en cas d'augmentation statistiquement significative de la VTG chez les mâles ($p < 0,05$) ou de baisse statistiquement significative chez les femelles ($p < 0,05$), et ce au moins à la concentration maximale soumise à l'essai par rapport au groupe témoin, et en l'absence de signes de toxicité générale. Un résultat positif est en outre confirmé par la démonstration d'une relation dose-réponse biologiquement plausible. Comme mentionné précédemment, la baisse de la VTG peut ne pas être entièrement liée au système endocrinien; toutefois un résultat positif est en général interprété comme un élément de preuve d'une activité du système endocrinien *in vivo*, et motive normalement des actions visant à une clarification plus poussée.
57. L'évaluation de l'histopathologie gonadique peut être requise par les autorités réglementaires pour déterminer l'aptitude reproductive des animaux d'essai et permettre d'évaluer les résultats de l'essai fondée sur le poids de la preuve. L'histopathologie gonadique peut ne pas être nécessaire lorsqu'un des effets mesurés ciblés par l'essai, à savoir la VTG ou les caractères sexuels secondaires, est positif (c'est-à-dire si l'on constate une augmentation ou une diminution de la VTG, ou l'apparition de caractères sexuels secondaires).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 60, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 61, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 78, OCDE, Paris.

- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OCDE (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 94, OCDE, Paris.
- (7) Sumpter J.P., et S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S., et al. (2004), Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L., et al. (2006), Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley G.T., et autres (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) Panter G.H., et al. (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks L.G., et al. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter G.H., et al. (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., et al. (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H., et al. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J., et al. (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F., et al. (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H., et al. (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N., et al. (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley G.T., et al. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- (21) Seki M, *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
 - (22) OCDE (2010). *Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology*. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 123, OCDE, Paris.
 - (23) OCDE (2000) *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 23, OCDE, Paris
 - (24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - (25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - (26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (28) OCDE (2006c), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 54, OCDE, Paris.
 - (29) US EPA (2008), *Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay*, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
 - (30) OCDE (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 150, OCDE, Paris.
-

Appendice 1

ABRÉVIATIONS & DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange

CV: coefficient de variation

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): procédé immunochimique d'absorption enzymatique

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Taux de charge: poids frais de poissons par unité de volume d'eau

CMT: concentration maximale tolérée représentant environ 10 % de la CL₅₀

Densité de peuplement: nombre de poissons par unité de volume d'eau

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

VTG: la vitellogénine est une lipo-glyco-phosfo-protéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares

Appendice 2

**CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DU PROTOCOLE DE DEPISTAGE DES SUBSTANCES AGISSANT SUR
LE SYSTÈME ENDOCRINIEN DES POISSONS NON REPRODUCTEURS**

| | | | |
|---|--|--|--|
| 1. Espèces recommandées | Tête-de-boule (<i>Pimephales promelas</i>) | Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) | Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) |
| 2. Type d'essai | dynamique | dynamique | dynamique |
| 3. Température de l'eau | 25 ± 2°C | 25 ± 2°C | 26 ± 2°C |
| 4. Qualité de l'éclairage | Ampoules fluorescentes (à large spectre) | Ampoules fluorescentes (à large spectre) | Ampoules fluorescentes (à large spectre) |
| 5. Intensité de l'éclairage | 10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) | 10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) | 10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) |
| 6. Photopériode (transitions — aube et crépuscule — optionnelles, mais non considérées comme nécessaires) | 16 h de lumière, 8 h d'obscurité | 12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité | 12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité |
| 7. Taux de charge | <5 g/l | < 5 g/l | <5 g/l |
| 8. Volume des enceintes d'essai | 10 l (minimum) | 2 l (minimum) | 5 l (minimum) |
| 9. Volume de la solution d'essai | 8 l (minimum) | 1,5 l (minimum) | 4 l (minimum) |
| 10. Remplacement volumique des solutions d'essai | Minimum 6 fois/jour | Minimum 5fois/jour | Minimum 5fois/jour |
| 11. Âge des organismes d'essai | voir § 21 | voir § 21 | voir § 21 |
| 12. Poids frais approximatif des poissons adultes (g) | femelles: 1,5 ± 20 % mâles: 2,5 ± 20 % | femelles: 0,35 ± 20 % mâles: 0,35 ± 20 % | femelles: 0,65 ± 20 % mâles: 0,4 ± 20 % |
| 13. Nombre de poissons par récipient | 6 (2 mâles et 4 femelles) | 6 (3 mâles et 3 femelles) | 10 (5 mâles and 5 femelles) |
| 14. Nombre de traitements | = 3 (plus témoins appropriés) | = 3 (plus témoins appropriés) | = 3 (plus témoins appropriés) |
| 15. Nombre de récipient par traitement | 4 minimum | 4 minimum | 2 minimum |
| 16. Nombre de poissons par concentration d'essai | 16 adultes femelles et 8 mâles (4 femelles et 2 mâles dans chaque répliquat) | 12 adultes femelles et 12 mâles (3 femelles et 3 mâles dans chaque répliquat) | 10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque répliquat) |

| | | | |
|---|--|--|--|
| 17. Régime alimentaire | Artémies adultes ou nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (<i>ad libitum</i>), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments | Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (<i>ad libitum</i>), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments | Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (<i>ad libitum</i>), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments |
| 18. Aération | Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA) | Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA) | Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA) |
| 19. Eau de dilution | Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée | Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée | Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée |
| 20. Période de pré-exposition | 7-14 jours (recommandé) | 7-14 jours (recommandé) | 7-14 jours (recommandé) |
| 21. Durée de l'exposition au produit chimique | 21 jours | 21 jours | 21 jours |
| 22. Effets biologiques mesurés | <ul style="list-style-type: none"> — survie — comportement — fécondité — caract. sexuels secondaires — VTG — histopathologie gonadique (optionnel) | <ul style="list-style-type: none"> — survie — comportement — fécondité — caract. sexuels secondaires — VTG — histopathologie gonadique (optionnel) | <ul style="list-style-type: none"> — survie — comportement — fécondité — VTG — histopathologie gonadique (optionnel) |
| 23. Critères de validité de l'essai | Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement | Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement | Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement |

Appendice 3

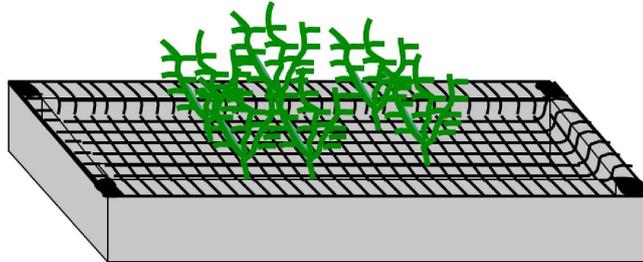
QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

| PARAMÈTRE | CONCENTRATION |
|---|---------------|
| Matières particulaires | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Pesticides organophosphorés totaux | < 50 ng/l |
| Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |

Appendice 4A

SUBSTRAT DE FRAI POUR LES POISSONS-ZÈBRES

Plateau de frai: plat à instruments en verre, mesurant par exemple 22 × 15 × 5,5 cm (L × l × h), recouvert d'une grille amovible en acier inoxydable (mailles de 2 mm de largeur). La base de cette grille se trouve plus bas que le bord du plat.



Le substrat de frai est fixé sur la grille. Il forme une structure dans laquelle les poissons peuvent pénétrer. Des plantes d'aquarium artificielles en plastique vert, par exemple, peuvent convenir (NB: l'adsorption possible du produit chimique d'essai sur la matière plastique est prise en compte). Le plastique est lessivé dans un volume suffisant d'eau chaude et pendant un temps suffisant pour qu'aucun produit chimique ne risque de se retrouver dans la solution d'essai. Si des objets en verre sont utilisés, on veille à ce que les poissons ne soient ni blessés ni entravés lors de mouvements vigoureux.

La distance entre le plateau et les parois du récipient est d'au moins 3 cm pour que le frai ne se fasse pas à l'extérieur du plateau. Les œufs déposés sur le plateau traversent la grille et peuvent être prélevés 45 à 60 minutes après le début de l'éclairage. Les œufs translucides n'adhèrent pas et peuvent facilement être comptés grâce une lumière transversale. Pour cinq femelles par récipient, le nombre d'œufs pondus peut être considéré comme faible s'il est inférieur ou égal à 20 par jour, moyen s'il est compris entre 20 et 100, et élevé s'il est supérieur à 100. Le plateau de frai est retiré, les œufs ramassés et le plateau de frai réintroduit dans le récipient d'essai, le plus tard possible dans la soirée ou bien très tôt le matin. La réintroduction du plateau se fait dans un délai maximum d'une heure car sinon le signal du substrat de frai peut induire un accouplement et un frai à un moment inhabituel. Si la situation nécessite une introduction ultérieure du plateau de frai, il convient d'attendre au moins neuf heures après le début de l'éclairage. À cette heure tardive de la journée, l'induction de frai ne se fait plus.

Appendice 4B

SUBSTRAT DE FRAI POUR LES TÊTES-DE-BOULE

Deux ou trois plaques et plateaux de frai en plastique/céramique/verre ou en acier inoxydable combinés sont placés dans chaque enceinte d'essai (morceau de gouttière semi-circulaire grise de 80 mm de longueur posé sur un plateau à rebords de 130 mm de long, par exemple) (voir photo). Il est avéré que les plaques en PVC ou en céramique vieilles pouvaient convenablement servir de substrat de frai (Thorpe *et al*, 2007).

Il est recommandé d'utiliser des plaques abrasées pour améliorer l'adhérence. Le plateau est aussi muni d'un écran de protection empêchant les poissons d'accéder aux œufs tombés, à moins que l'efficacité de l'adhérence des œufs ait été démontrée pour le substrat de frai utilisé.



Le socle est conçu pour contenir tous les œufs qui n'adhèrent pas à la surface des plaques et tomberaient donc au fond de l'enceinte (ou les œufs déposés directement sur le socle en plastique plat). Tous les substrats de frai sont lessivés pendant au moins 12 heures dans l'eau de dilution avant leur utilisation.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Appendice 5A

ÉVALUATION DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES DU TÊTE-DE-BOULE POUR LA DÉTECTION DE CERTAINS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**Synthèse**

Chez les têtes-de-boule adultes, les caractéristiques physiques pouvant avoir de l'importance dans les essais de perturbateurs endocriniens sont les suivantes: couleur (claire/sombre), motifs de coloration (présence ou absence de bandes verticales), forme du corps (région de la tête et région pectorale, distension de l'abdomen) et caractères sexuels secondaires spécifiques de l'espèce (nombre et taille des tubercules nuptiaux, taille du bourrelet dorsal et ovipositeur).

Les tubercules nuptiaux sont situés sur la tête (bourrelet dorsal) des têtes-de-boule adultes mâles reproducteurs, et sont généralement disposés bilatéralement et symétriquement (Jensen *et al.* 2001). Les femelles et les juvéniles mâles et femelles des témoins ne développent pas de tubercule (Jensen *et al.* 2001). Il est possible de dénombrer jusqu'à huit tubercules individuels autour des yeux et entre les narines des mâles. Les tubercules les plus importants en nombre et en taille forment deux lignes parallèles situées juste en dessous des narines et au-dessus de la bouche. De nombreux poissons possèdent des groupes de tubercules sous la mâchoire inférieure; tout près de la bouche on en trouve généralement une seule paire alors que le ventre peut comprendre jusqu'à quatre tubercules. Le nombre de tubercules dépasse rarement 30 (fourchette, 18-28; Jensen *et al.* 2001). Les tubercules les plus nombreux forment une seule et même structure de forme plutôt arrondie, dont la hauteur est à peu près égale au rayon. Chez la plupart des mâles reproducteurs, certains tubercules sont si étendus et protubérants qu'il est impossible de les distinguer les uns des autres.

Certains types de perturbateurs endocriniens peuvent provoquer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez le sexe opposé; ainsi, les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que la 17 α -méthyltestostérone ou le 17 β -trenbolone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule femelle (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003), tandis que les agonistes des récepteurs d'oestrogènes peuvent réduire le nombre ou la taille des tubercules nuptiaux chez les mâles (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000).

On trouvera ci-après une description de la caractérisation des tubercules nuptiaux chez les têtes-de-boule, fondée sur le mode opératoire utilisé par le laboratoire de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) à Duluth, Minnesota. Les produits et/ou équipements spécifiques peuvent être remplacés par des matériaux comparables disponibles.

L'utilisation d'une loupe à éclairage ou d'un microscope binoculaire de dissection à éclairage (3X) permet une observation optimale. On observera le poisson en position dorsale, partie antérieure vers l'avant (tête vers l'observateur).

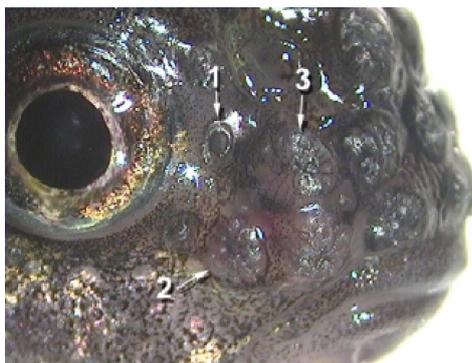
- Placer le poisson dans une petite boîte de Pétri (100 mm de diamètre, par exemple), sur le dos, partie antérieure vers l'avant. Régler le viseur pour pouvoir identifier les tubercules. Faire rouler doucement le poisson d'un côté puis de l'autre pour identifier les zones où se trouvent les tubercules. Compter et classer les tubercules.
- Renouveler l'observation sur la partie ventrale antérieure après avoir placé le poisson sur le dos, partie antérieure vers l'avant, dans la boîte de Pétri.
- Les observations ne doivent pas prendre plus de 2 minutes par poisson.

Dénombrement et classement des tubercules

Six zones spécifiques ont été identifiées pour l'évaluation de la présence et du développement de tubercules chez les têtes-de-boule adultes. Une matrice a été créée pour cartographier la localisation des tubercules et la quantité de tubercules présents (voir la fin du présent appendice). Le nombre de tubercules est consigné, et les tubercules peuvent être classés comme suit en fonction de leur taille: 0-absence, 1-présent, 2-agrandi et 3-protubérant pour chaque organisme (photo 1).

Classe 0-absence de tout tubercule. Classe 1-tubercule présent, identifié comme tout tubercule dont un seul point est de hauteur presque égale à son rayon. Classe 2-tubercule agrandi, identifié par des tissus ressemblant à un astérisque, présentant généralement une large base radiale marquée de stries et de sillons partant du centre. La hauteur des tubercules est souvent plus irrégulière mais peut parfois être un peu arrondie. Classe 3-tubercule protubérant, de forme généralement plutôt large et arrondie et de structure moins bien définie. Ces tubercules s'agglomèrent parfois pour former une seule et même masse le long d'une zone ou de plusieurs zones (B, C et D, voir description ci-dessous). Leur couleur et leur forme sont similaires à celles de la classe 2, mais sont parfois assez indéterminées. Ce système de classement permet généralement d'obtenir un résultat global < 50 chez un mâle témoin normal possédant un nombre de tubercules compris entre 18 et 20 (Jensen *et al.* 2001).

Photo 1



Certains poissons peuvent présenter plus de tubercules que la matrice ne compte de cases pour une zone particulière. Dans ce cas, des chiffres supplémentaires peuvent être indiqués à l'intérieur, à droite ou à gauche de la case. La matrice n'a donc pas besoin d'afficher une symétrie. Une autre technique permettant de cartographier les tubercules allant par paires ou réunis verticalement le long du plan horizontal de la bouche pourrait consister à indiquer deux chiffres dans une seule case.

Zones cartographiées:

A — Tubercules situés autour des yeux. Localisés de dorsal à ventral autour du bord antérieur des yeux. Couramment multiples chez les mâles témoins mûrs, absents chez les femelles témoins, généralement par paires (un près de chaque œil) ou uniques chez les femelles exposées à des androgènes.

B-Tubercules situés entre les narines (pores-canaux sensoriels). Normalement par paires chez les mâles témoins à des niveaux de développement supérieurs (2-agrandi ou 3-protubérants). Absents chez les femelles témoins mais parfois présents chez les femelles exposées à des androgènes.

C — Tubercules situés immédiatement devant les narines, parallèlement à la bouche. Généralement agrandis ou protubérants chez les mâles témoins mûrs. Présents ou agrandis chez les mâles moins développés ou chez les femelles exposées à des androgènes.

D — Tubercules situés parallèlement à la bouche. Généralement classés «développés» chez les mâles témoins. Absents chez les femelles témoins mais présents chez les femelles exposées à des androgènes.

E — Tubercules situés sur la mâchoire inférieure, près de la bouche, généralement petits et par paires. Variables chez les mâles témoins ou traités et chez les femelles traitées.

F — Tubercules situés sous la zone E. Généralement petits et par paires. Présents chez les mâles témoins et chez les femelles exposées à des androgènes.

RÉFÉRENCES

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Matrice pour la cartographie des tubercules:

N° ident. ____

Date _____

Score total _____

Classification numérique

1-présent

2-agrandi

3-protubérant

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | A | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | B | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | | | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | C | X1 |
| | D | X1 |

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | | E | X1 | X1 | |
| | F | X1 | X1 | X1 | X1 |

Appendice 5B

ÉVALUATION DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES DU MEDAKA POUR LA DÉTECTION DE CERTAINS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

La mesure des tubercules papillaires (*), qui sont les caractères sexuels secondaires du medaka (*Oryzias latipes*) est décrite ci-après.

- (1) Après excision du foie (appendice 6), la carcasse est placée dans un tube conique contenant 10 ml environ de formol tamponné à 10 % (tête en haut, queue en bas). Si la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %, pratiquer à l'aide d'un rasoir une incision transversale dans la carcasse entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus, en prenant soin de ne pas abîmer le gonopore et la gonade (fig.3). Placer la partie tête du corps du poisson dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la partie queue dans du formol tamponné à 10 % tel que décrit ci-dessus.
- (2) Après avoir placé le poisson dans du formol tamponné à 10 %, saisir la région antérieure de la nageoire anale avec des pincettes et la plier pendant une trentaine de secondes pour que la nageoire anale reste ouverte. En prenant la nageoire anale avec les pincettes, saisir quelques rayons de nageoire dans la région antérieure en prenant soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires.
- (3) Après avoir maintenu la nageoire anale ouverte pendant une trentaine de secondes, placer le poisson dans du formol tamponné à 10 % à température ambiante jusqu'à la mesure des tubercules papillaires (cette mesure est effectuée au bout de 24 heures minimum).

Mesure

- (1) Après avoir fixé le poisson dans le formol tamponné à 10 % pendant au moins 24 heures, retirer la carcasse du tube conique et essuyer le formol avec du papier filtre (ou essuie-tout).
- (2) Placer le poisson abdomen vers le haut. Découper ensuite soigneusement la nageoire anale avec de petits ciseaux à dissection (il est préférable de découper la nageoire anale avec un peu de rayon endosquelettique).
- (3) Saisir la région antérieure de la nageoire anale excisée avec des pincettes et la poser sur une lame de verre avec quelques gouttes d'eau. Couvrir ensuite la nageoire anale avec une lamelle couvre-objet. Prendre soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires en prenant la nageoire anale avec les pincettes.
- (4) Noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires à l'aide du compteur placé sous un microscope biologique (microscope droit ou microscope inversé). On reconnaît les tubercules papillaires à la petite formation de tubercules visible sur le côté postérieur des plaques conjointes. Inscrire sur la feuille de travail le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires pour chaque rayon de nageoire (premier rayon: 0, deuxième rayon: 10, troisième rayon: 12, etc.) puis inscrire leur somme sur la feuille Excel pour chaque poisson. Si nécessaire, photographier la nageoire anale et noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires sur la photo.
- (5) Après la mesure, placer la nageoire anale dans le tube conique décrit en (1) et le stocker.

(*) Les tubercules papillaires sont normalement présents uniquement chez les mâles adultes, et se situent entre le deuxième et le septième ou le huitième rayon de nageoire en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale (fig.1 et 2). Ils apparaissent rarement sur le premier rayon en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale. Cette procédure opératoire standard (POS) permet de mesurer les tubercules présents sur le premier rayon de nageoire (le numéro du rayon est déterminé en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale dans cette POS).

Fig.1.

Schéma illustrant la différence de forme et de taille de la nageoire anale entre les sexes. A, mâle; B, femelle. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci., Tokyo Univ.*, IV, 2: 209-218.

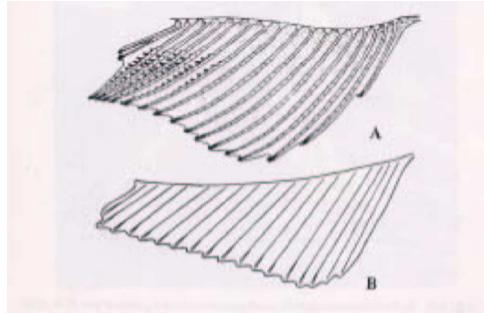


Fig.2.

A, Tubercules papillaires situés sur les plaques conjointes de la nageoire anale. J.P: plaque conjointe; A.S.: espace axial; P: tubercule. B, Extrémité distale de la nageoire anale. Les actinotriches (Act.) sont situés à l'extrémité. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci., Tokyo Univ.*, IV, 2: 209-218.

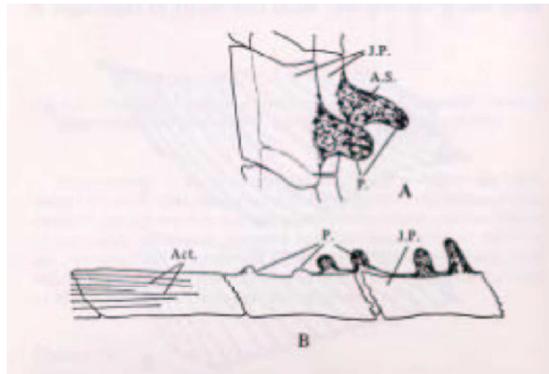
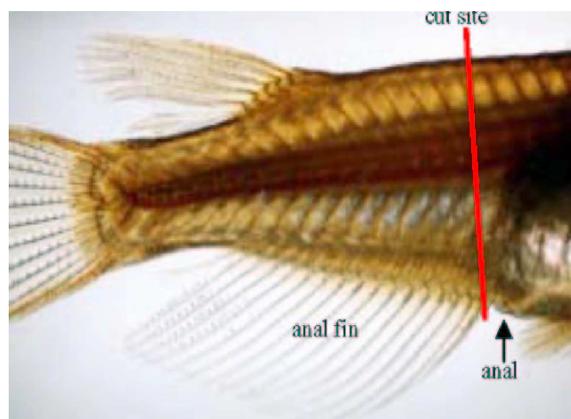


Fig.3.

Photographie montrant le site de coupe lorsque la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %. Dans ce cas, le corps restant sera coupé entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus à l'aide d'un rasoir (trait rouge). La tête sera placée dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la queue dans le formol tamponné à 10 %.



Appendice 6

PROCÉDURES RECOMMANDÉES POUR LES PRÉLÈVEMENTS EFFECTUÉS À DES FINS DE DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE

On prendra soin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons de VTG des mâles et des femelles.

Procédure 1A: tête-de-boule, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Après anesthésie, le pédoncule caudal est partiellement sectionné avec une lame de scalpel, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Après le prélèvement sanguin, le plasma est rapidement séparé par centrifugation à température ambiante pendant 3 minutes à 15 000 g (ou bien à une température de 4°C pendant 10 minutes à 15 000 g). Le pourcentage d'hématocrite peut éventuellement être déterminé à l'issue de la centrifugation. Le plasma est ensuite retiré du tube à microhématocrite puis stocké dans un tube de centrifugeuse avec 0.13 unité d'aprotinine (un inhibiteur de protéase) à - 80°C jusqu'au dosage de la VTG. Selon la taille du tête-de-boule (qui dépend du sexe), les volumes de plasma pouvant être prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu (Jensen *et al.* 2001).

Procédure 1B: tête-de-boule, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Il est également possible d'effectuer un prélèvement sanguin par ponction cardiaque effectuée à l'aide d'une seringue héparinisée (1 000 unités d'héparine par ml). Le sang est versé dans des tubes Eppendorf (maintenus dans de la glace) avant d'être centrifugé (5 minutes à 7 000 g à température ambiante). Le plasma est versé dans des tubes Eppendorf propres (dans des aliquotes si le volume de plasma le permet) puis rapidement congelé à - 80°C jusqu'à l'analyse (Panter *et al.*, 1998).

Procédure 2A: Medaka japonais, excision du foie

Retrait des poissons d'essai de l'enceinte d'essai

- (1) Les poissons d'essai sont sortis de l'enceinte d'essai à l'aide d'une épuisette. Attention à ne pas laisser tomber les poissons dans une autre enceinte d'essai.
- (2) En principe, les poissons d'essai sont retirés dans l'ordre suivant: témoin, témoin solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif. De plus, tous les mâles sont retirés de l'enceinte d'essai avant les femelles.
- (3) Le sexe de chaque poisson d'essai est identifié à partir des caractères sexuels secondaires externes (forme de la nageoire anale, par exemple).
- (4) Placer les poissons dans un conteneur puis les transporter jusqu'au poste de travail pour l'excision du foie. Vérifier les étiquettes de l'enceinte d'essai et du conteneur de transport par souci de précision et pour confirmer que le nombre de poissons sortis de l'enceinte d'essai et le nombre de poissons restés dans l'enceinte d'essai sont compatibles avec les prévisions.
- (5) Si le sexe ne peut pas être identifié d'après l'apparence externe du poisson, sortir tous les poissons de l'enceinte d'essai. Dans ce cas, le sexe est identifié par observation de la gonade ou des caractères sexuels secondaires au stéréomicroscope.

Excision du foie

- (1) Transférer les poissons d'essai du conteneur de transport vers la solution anesthésique avec l'épuisette.
- (2) après anesthésie, saisir les poissons d'essai avec des pinces (de modèle courant) pour les déposer sur le papier filtre (ou essuie-tout). En saisissant les poissons, appliquer les pinces sur les côtés de la tête pour éviter de casser la queue.
- (3) Essuyer l'eau de la surface des poissons d'essai avec le papier filtre (ou essuie-tout).

- (4) Placer les poissons sur le dos. Pratiquer ensuite une petite incision transversale entre la région ventre-nuque et le milieu de l'abdomen avec des ciseaux à dissection.
- (5) Introduire les ciseaux à dissection dans la petite incision, et inciser l'abdomen le long de sa ligne médiane, depuis un point caudal par rapport au manteau branchial jusqu'au côté cranien de l'anus. Attention à ne pas introduire les ciseaux à disséquer trop profondément pour ne pas abîmer le foie et la gonade.
- (6) Mener les opérations suivantes sous le stéréomicroscope.
- (7) Placer les poissons sur le dos sur l'essuie-tout (ou une boîte de Pétri en verre ou une lame de verre).
- (8) Écarter les parois de la cavité abdominale avec les pinces de précision puis extérioriser les organes internes. Il est également possible d'extérioriser les organes internes en retirant l'une des parois de la cavité abdominale si nécessaire.
- (9) Étaler la partie qui relie le foie et la vésicule biliaire à l'aide d'une autre paire de pinces de précision. Saisir ensuite le canal biliaire et couper la vésicule biliaire. Veiller à ne pas rompre la vésicule biliaire.
- (10) Saisir l'œsophage et exciser les intestins du foie selon la même méthode. Veiller à ce que le contenu du tube digestif ne s'échappe pas. Exciser l'intestin caudal de l'anus et retirer le tractus de la cavité abdominale.
- (11) Retirer la masse de tissus gras et autres situés à la périphérie du foie. Prendre soin de ne pas abîmer le foie.
- (12) Saisir la zone de la porte hépatique avec les pinces de précision et retirer le foie de la cavité abdominale.
- (13) Placer le foie sur la lame de verre. À l'aide des pincettes de précision, retirer les autres tissus gras et étrangers (paroi abdominale interne, par exemple), s'il y a lieu, de la surface du foie.
- (14) Peser le foie au moyen d'une balance de précision électronique, en utilisant comme tare un microtube de 1,5 ml. Consigner la valeur sur la feuille de travail (précision à 0,1 mg près). Confirmer les informations d'identification sur l'étiquette du microtube.
- (15) Fermer le capuchon du microtube contenant le foie. Stocker le microtube dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).
- (16) Après chaque excision de foie, nettoyer les instruments de dissection ou les remplacer par des instruments propres.
- (17) Retirer le foie de tous les poissons se trouvant dans les conteneurs de transport comme indiqué ci-dessus.
- (18) Après excision du foie de tous les poissons se trouvant dans le conteneur de transport (c'est-à-dire de tous les mâles et de toutes les femelles d'une enceinte d'essai), placer tous les spécimens hépatiques sur un support pour tubes muni d'une étiquette d'identification puis les stocker dans un congélateur. Lorsque les foies sont fournis pour pré-traitement peu de temps après leur excision, les spécimens sont transportés jusqu'au poste de travail le plus proche dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

Après excision du foie, la carcasse est prête pour l'histologie gonadique et la mesure des caractères sexuels secondaires.

Spécimens

Stocker les spécimens hépatiques prélevés sur les poissons d'essai à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$ s'ils ne sont pas utilisés pour le pré-traitement juste après leur excision.

Fig-1

Une incision est pratiquée avec des ciseaux juste avant les nageoires pectorales.

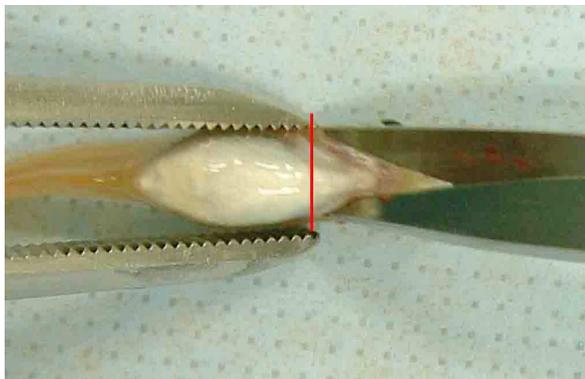


Fig-2

La ligne médiane de l'abdomen est incisée avec des ciseaux jusqu'à un point situé environ 2 mm au-dessus de l'anus.



Fig-3

Les parois abdominales sont écartées avec des pinces pour exposer le foie et les autres organes internes (elles peuvent aussi être épinglées latéralement).

La flèche montre le foie.

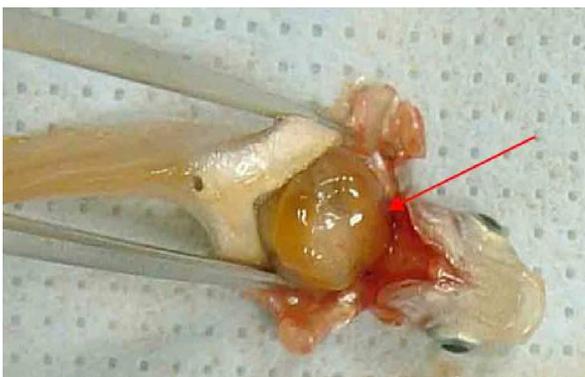


Fig-4

Le foie est disséqué et excisé avec des pinces.

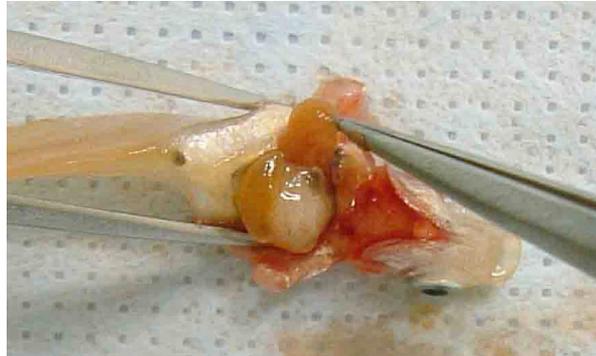


Fig-5

Les intestins sont délicatement retirés avec des pinces.

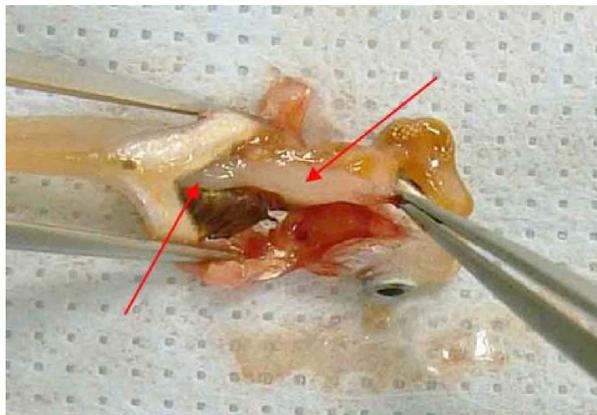


Fig-6

Les deux extrémités des intestins et les attaches du mésentère sont sectionnées avec des ciseaux.

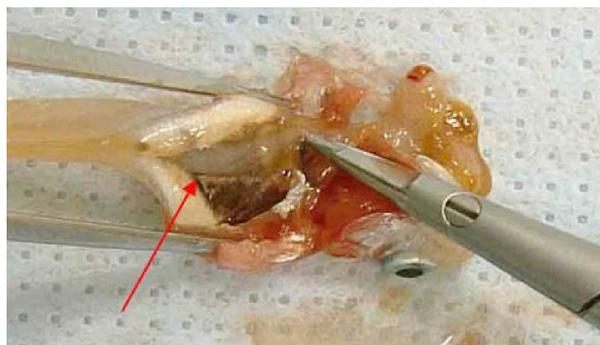


Fig-7 (femelle)

La procédure est identique pour les femelles.

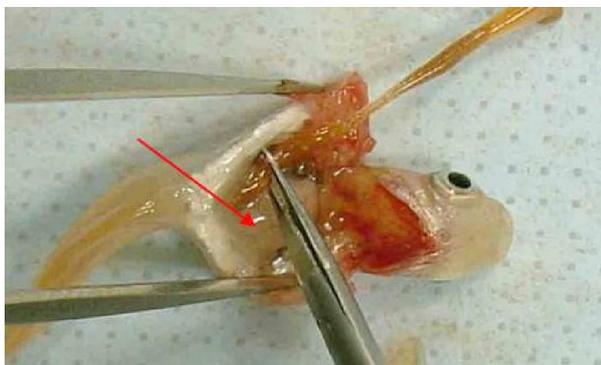


Fig-8

Procédure achevée.



Procédure 2 B: Medaka japonais (*Oryzias latipes*), pré-traitement du foie pour le dosage de la vitellogénine

Retirer la bouteille contenant le tampon d'homogénéat du kit ELISA et la refroidir avec de la glace pilée (température de la solution: ≤ 4 °C). Si un tampon d'homogénéat provenant d'un kit ELISA EnBio est utilisé, laisser décongeler la solution à température ambiante, puis conserver la bouteille au frais avec de la glace pilée.

Calculer le volume de tampon d'homogénéat pour le foie à partir du poids de ce dernier (utiliser 50 μ l de tampon d'homogénéat par mg de foie). Exemple: Si le foie pèse 4,5 mg, le volume de tampon d'homogénéat pour le foie sera de 225 μ l. Dresser une liste des volumes de tampon d'homogénéat pour tous les foies.

Préparation du foie pour le pré-traitement

- (1) Retirer le microtube de 1,5 ml contenant le foie du congélateur juste avant le pré-traitement.
- (2) Le pré-traitement du foie des mâles est effectué avant celui des femelles pour éviter toute contamination de la vitellogénine. De plus, le pré-traitement des groupes d'essai est effectué dans l'ordre suivant: témoin, témoin solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif.

- (3) Le nombre de microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques sortis du congélateur à un moment donné ne dépasse pas le nombre de tubes pouvant être centrifugés à ce moment-là.
- (4) Placer les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens (la décongélation du foie n'est pas utile).

Déroulement du pré-traitement

1) Ajout du tampon d'homogénéat

Vérifier sur la liste le volume de tampon d'homogénéat à utiliser pour un échantillon hépatique particulier et ajuster la micropipette (gamme de volumes: 100-1 000 µl) au volume approprié. Attacher un embout propre à la micropipette.

Retirer le tampon d'homogénéat du flacon de réactif et ajouter le tampon dans le microtube de 1,5 ml contenant le foie.

Ajouter le tampon dans tous les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques selon la procédure décrite ci-dessus. Il n'est pas nécessaire de remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf. Toutefois, si l'embout est contaminé ou suspect de contamination, il est changé.

2) Homogénéisation du foie

- Attacher un nouveau pilon d'homogénéisation à l'homogénéisateur du microtube.
- Introduire le pilon dans le microtube de 1,5 ml. Maintenir l'homogénéisateur pour presser le foie entre la surface du pilon et la paroi interne du microtube.
- Faire fonctionner l'homogénéisateur pendant 10 à 20 secondes. Conserver le microtube au frais avec de la glace pilée pendant l'opération.
- Retirer le pilon du microtube et laisser reposer pendant une dizaine de secondes. Procéder ensuite à une inspection visuelle de l'état de la suspension.
- Si des morceaux de foie sont observés dans la suspension, répéter les opérations (3) et (4) pour obtenir un homogénéat de foie satisfaisant.
- Conserver l'homogénéat hépatique en suspension dans le bac de glace jusqu'à sa centrifugation.
- Utiliser un pilon neuf pour chaque homogénéat.
- Homogénéiser tous les foies avec un tampon d'homogénéat selon la procédure décrite ci-dessus.

3) Centrifugation de l'homogénéat hépatique en suspension

- Confirmer que la température de la centrifugeuse réfrigérée est ≤ 5 °C.
- Introduire les microtubes de 1,5 ml contenant l'homogénéat hépatique en suspension dans la centrifugeuse réfrigérée (rééquilibrer s'il y a lieu).
- Centrifuger l'homogénéat hépatique en suspension pendant 10 minutes à 13 000 g à une température ≤ 5 °C. Toutefois, si les surnageants sont correctement séparés, la force centrifuge et la durée de centrifugation peuvent être ajustées s'il y a lieu.
- Après la centrifugation, vérifier que les surnageants sont correctement séparés (surface: lipides, intermédiaire: surnageant, culot: tissu hépatique). Si la séparation n'est pas concluante, renouveler la centrifugation de la suspension dans les mêmes conditions.
- Retirer tous les échantillons de la centrifugeuse réfrigérée et les placer dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens. Prendre soin de ne pas remettre en suspension les couches séparées après centrifugation.

4) Collecte du surnageant

- Placer quatre microtubes de 0,5 ml destinés au stockage du surnageant sur le support pour tubes.
- Recueillir 30 µl de chaque surnageant (formant la couche intermédiaire après séparation) à l'aide de la micropipette et les verser dans un microtube de 0,5 ml. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.
- Recueillir le surnageant et le verser dans deux autres microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.
- Recueillir le reste du surnageant à l'aide de la micropipette (si possible: ≥ 100 µl). Verser ensuite le surnageant dans le microtube de 0,5 ml restant. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.
- Fermer le microtube de 0,5 ml avec le capuchon et inscrire le volume de surnageant sur l'étiquette. Placer immédiatement les microtubes dans le bac de glace.
- Remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf pour chaque surnageant. Si une grande quantité de lipides adhère à l'embout, remplacer immédiatement ce dernier par un embout neuf pour éviter la contamination de l'extrait hépatique avec la graisse.
- Verser tout le surnageant centrifugé dans quatre microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.
- Après avoir versé le surnageant dans les microtubes de 0,5 ml, placer tous ces derniers sur le support pour tubes avec leur étiquette d'identification, puis les mettre immédiatement au congélateur. Si les concentrations de VTG sont mesurées immédiatement après le pré-traitement, conserver au frais un microtube de 0,5 ml (contenant 30 µl de surnageant) dans le support pour tubes et le transférer jusqu'au poste de travail où l'essai ELISA est conduit. Dans ce cas, placer les microtubes restants dans les supports pour tubes et mettre le tout au congélateur.
- Après la collecte du surnageant, jeter le résidu de manière appropriée.

Stockage des spécimens

Stocker les microtubes de 0,5 ml contenant le surnageant de l'homogénat hépatique à une température ≤ -70 °C jusqu'à la conduite de l'essai ELISA.

Procédure 3A: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Immédiatement après anesthésie, le pédoncule caudal est sectionné transversalement, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Les volumes sanguins collectés varient entre 5 et 15 µl selon la taille du poisson. Un volume identique de tampon d'aprotinine [6 microgrammes/ml de solution tampon phosphate (PBS)] est ajouté dans le tube microcapillaire, et le plasma est séparé du sang par centrifugation (5 minutes à 600 g). Le plasma est versé dans des tubes à essais puis stocké à une température de -20 °C jusqu'au dosage de la VTG ou d'autres protéines produisant des effets intéressants.

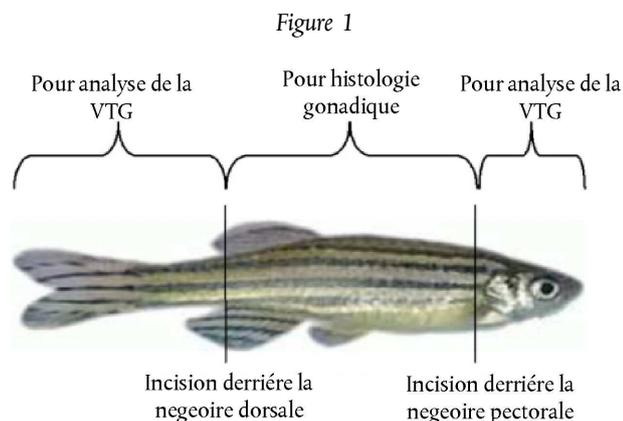
Procédure 3B: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Pour éviter la coagulation du sang et la dégradation de la protéine, les échantillons sont collectés sur une solution tampon phosphate (PBS) contenant de l'héparine (1 000 unités/ml) et de l'aprotinine, un inhibiteur de protéase (2 TIU/ml). Pour constituer le tampon, il est recommandé d'utiliser de l'héparine, du sel d'ammonium et de l'aprotinine lyophilisée. Pour le prélèvement sanguin, une seringue (1 ml) munie d'une fine aiguille fixe (Braun Omnikan-F, par exemple) est recommandée. La seringue est pré-remplie avec le tampon (environ 100 microlitres) afin d'éluer complètement les faibles volumes sanguins de chaque poisson. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction cardiaque. Tout d'abord, le poisson est anesthésié avec du MS-222 (100 mg/l). Le bon plan d'anesthésie est celui qui permet à l'utilisateur de distinguer le battement du cœur du poisson-zèbre. Pendant la ponction cardiaque, maintenir le piston de la seringue sous faible tension. Les volumes sanguins pouvant être collectés varient entre 20 et 40 microlitres. Après la ponction cardiaque, le mélange sang/tampon est placé dans le tube à essais. Le plasma est séparé du sang par centrifugation (20 minutes à 5 000 g) et est stocké à une température de -80 °C jusqu'à l'analyse.

Procédure 3C: MON: Poisson-zèbre, homogénéisation de la tête et de la queue

1. Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.
2. La tête et la queue du poisson sont coupées comme indiqué sur la figure 1.

Note importante: Tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne «pollue» les mâles non-induits.



3. L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg près.
4. Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1.5 ml, par exemple) et stockés à une température de -80°C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisées sur de la glace avec deux pilons en plastique. (D'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). Note importante: Les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.
5. Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un **tampon d'homogénéisation** (*) glacé représentant 4 x la masse pondérale tissulaire. Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Note importante: De nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.
6. Les échantillons sont placés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de 4°C .
7. Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 μl de surnageant dans **au moins deux** tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.
8. Les tubes sont stockés à une température de -80°C jusqu'à leur utilisation.

(*) Tampon d'homogénéisation:

- [50 mM de Tris-HCl de pH 7,4; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)]: 12 ml de Tris-HCl de pH 7,4 + 120 μl de cocktail d'inhibiteurs de protéase.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) de chez Bie & Berntsen (Danemark), par exemple.
- Cocktail d'inhibiteurs de protéase: de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit P 8340.

NOTE: Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant son utilisation.

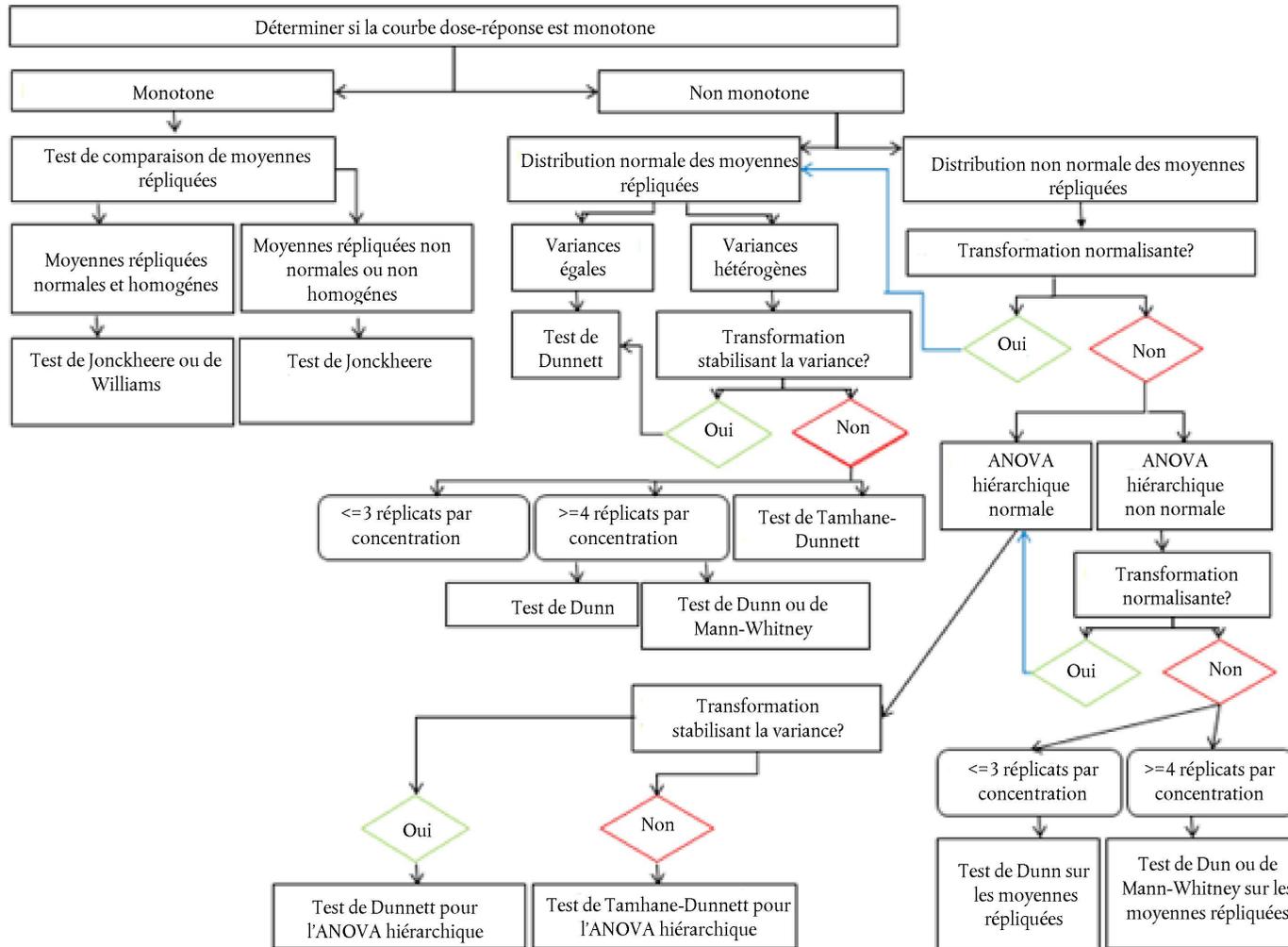
*Appendice 7***ÉCHANTILLONS SUPPLÉMENTÉS EN VITELLOGÉNINE ET ÉTALON DE RÉFÉRENCE INTER-ESSAIS**

Chaque jour où des essais d'induction de la VTG sont effectués, un échantillon supplémenté préparé à l'aide d'un étalon de référence inter-essais sera analysé. La VTG utilisée pour préparer l'étalon de référence inter-essais sera issue d'un lot différent de celui utilisé pour préparer les solutions-étalons pour l'essai en cours.

Pour préparer l'échantillon supplémenté, on ajoutera une quantité connue d'étalon inter-essais à un échantillon de plasma de mâle témoin. L'échantillon sera supplémenté jusqu'à atteindre une concentration de VTG de 10 à 100 fois supérieure à la concentration de vitellogénine attendue chez les mâles témoins. L'échantillon de plasma ainsi supplémenté peut provenir d'un seul poisson ou de plusieurs poissons.

Un sous-échantillon du plasma de mâle témoin non supplémenté sera analysé dans au moins deux puits dupliqués. L'échantillon supplémenté sera aussi analysé dans au moins deux puits dupliqués. La quantité moyenne de VTG dans les deux échantillons non supplémentés de plasma de mâle témoin sera ajoutée à la quantité calculée de VTG ajoutée pour fortifier les échantillons afin de déterminer la concentration attendue. Le rapport entre cette concentration attendue et la concentration mesurée sera noté avec les résultats de chaque série d'essais effectués le même jour.

ORDINOGRAMME D'ANALYSE STATISTIQUE



C.49 Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 236 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle décrit un essai de toxicité aiguë chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) au stade embryonnaire. Cet essai vise à déterminer la toxicité aiguë des produits chimiques sur les poissons au stade embryonnaire. Il repose sur des études et des activités de validation menées sur le poisson-zèbre (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Il a été appliqué avec succès à une large gamme de produits chimiques présentant différents modes d'action, solubilités, volatilités et hydrophobicités (voir les paragraphes 15 et 16).
2. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les œufs de poisson-zèbre fraîchement fécondés sont exposés au produit chimique d'essai durant une période de 96 heures. Toutes les 24 heures, jusqu'à quatre observations apicales utilisées comme indicateurs de létalité sont enregistrées (6): (i) la coagulation des œufs fécondés, (ii) l'absence de formation de somites, (iii) le non-détachement du bourgeon caudal dans le sac vitellin, (iv) l'absence de battements du cœur. À la fin de la période d'exposition, on détermine la toxicité aiguë d'après le résultat positif obtenu en ce qui concerne l'une des quatre observations apicales notées, et l'on calcule la CL_{50} .

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique d'essai, les informations suivantes sont utiles: formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, pK_a et $K_{o/e}$, hydrosolubilité, pression partielle de la forme gazeuse du composé ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile (méthode d'essai C.4 (17) ou C.29 (18)). On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique d'essai. Pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.
5. Si la méthode d'essai est utilisée pour tester un mélange, sa composition devrait être déterminée dans la mesure du possible, p.ex. par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leurs propriétés spécifiques (telles que mentionnées au paragraphe précédent). Avant d'utiliser la méthode d'essai pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.
6. En ce qui concerne les produits chimiques pouvant être activés via le métabolisme, des études montrent que les embryons de poisson-zèbre ont des capacités de biotransformation (18)(19)(20)(21). Cependant, la capacité métabolique des embryons de poissons n'est pas toujours du même ordre de grandeur que celle des poissons juvéniles ou adultes. Ainsi, les propriétés protoxiques de l'alcool allylique (9) n'ont pas été reconnues par le présent essai. Par conséquent, si certains éléments indiquent que les métabolites ou d'autres produits de transformation pertinents peuvent être plus toxiques que le composé initial, il est recommandé d'inclure également ces métabolites ou produits de transformation dans l'essai et d'utiliser également ces résultats au moment de conclure sur la toxicité du produit chimique d'essai, ou sinon de conduire un autre essai qui tient mieux compte du métabolisme.
7. On suppose que les embryons ne seront pas sensibles aux produits chimiques de poids moléculaire $\geq 3kDa$, dont l'encombrement moléculaire est très important, ou aux produits chimiques qui retardent l'éclosion, ce qui risque d'empêcher ou de réduire l'exposition après l'éclosion, en raison de la biodisponibilité limitée de ces produits chimiques, pour lesquels d'autres essais de toxicité pourraient être plus adaptés.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour établir la validité des résultats de l'essai, les critères suivants s'appliquent:
 - a) Le taux global de fécondation de l'ensemble des œufs collectés doit être supérieur ou égal à 70 % dans l'ensemble testé.

- b) La température de l'eau doit être maintenue à 26 ± 1 °C dans les enceintes d'essai pendant toute la durée de l'essai.
- c) Le taux global de survie des embryons dans le témoin négatif (contenant l'eau de dilution) et, le cas échéant, dans le témoin contenant le solvant doit être supérieur ou égal à 90 % jusqu'à la fin de la période d'exposition de 96 heures.
- d) L'exposition au témoin positif (4,0 mg/l de 3,4-dichloroaniline pour le poisson-zèbre, par exemple) doit avoir pour résultat une mortalité de 30 % minimum à la fin de la période d'exposition de 96 heures.
- e) Le taux d'éclosion dans le témoin négatif (et, le cas échéant, dans le témoin solvant) doit être supérieur ou égal à 80 % à la fin de la période d'exposition de 96 heures.
- f) À la fin de la période d'exposition de 96 heures, la concentration d'oxygène dissous dans le témoin négatif et la concentration d'essai maximale doivent être supérieures ou égales à 80 % de la valeur de saturation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

9. On trouvera à l'appendice 2 des indications sur les conditions d'entretien et d'expérimentation recommandées.

Appareillage

10. Le matériel suivant est nécessaire:
- a) récipients en verre ou tout autre matériau chimiquement inerte, suffisamment grands par rapport à la charge recommandée (voir le paragraphe 14, «Entretien des poissons géniteurs»);
 - b) microscope inversé et/ou binoculaire d'une capacité de grossissement d'au moins 80×. Si la température de la pièce où sont notées les observations ne peut pas être réglée à 26 ± 1 °C, une platine chauffante à mouvements croisés ou d'autres méthodes permettant de maintenir la température sont nécessaires;
 - c) enceintes d'essai; par exemple, plaques standard à 24 puits d'une profondeur de 20 mm environ (voir le paragraphe 10, «Enceintes d'essai»);
 - d) film autocollant, par exemple, pour couvrir les plaques 24 puits;
 - e) incubateur ou pièce climatisée avec température contrôlée, permettant le maintien de la température à 26 ± 1 °C dans les puits (ou les enceintes);
 - f) pH-mètre;
 - g) oxymètre;
 - h) matériel de détermination de la dureté de l'eau et de la conductivité;
 - i) piège à frai: plats à instruments en verre, acier inoxydable ou tout autre matériau inerte; grille (mailles de $2 \pm 0,5$ mm) en acier inoxydable ou tout autre matériau inerte pour protéger les œufs pondus; substrat de frai (plantes artificielles en matériau inerte, par exemple) [méthode d'essai C.48, appendice 4A (23)];
 - j) pipettes à large ouverture pour la collecte des œufs;
 - k) récipients en verre pour préparer différentes concentrations d'essai ainsi que l'eau de dilution (bêchers, fioles graduées, éprouvettes graduées et pipettes graduées) ou pour collecter les œufs de poisson-zèbre (bêchers, plats de cristallisation, etc.);
 - l) en cas de recours à un autre mode d'exposition tel qu'un système dynamique (24) ou passif (25) pour la conduite de l'essai, on utilisera les installations et matériels appropriés.

Enceintes d'essai

11. On utilisera des enceintes d'essai en verre ou en polystyrène (exemple: plaques à 24 puits d'une capacité de remplissage de 2,5 — 5 ml par puits). En cas de suspicion d'adsorption au polystyrène (substances planes non polaires, ayant un $K_{O/E}$ élevé, par exemple), on utilisera des matériaux inertes tels que le verre pour réduire les pertes dues à l'adsorption (26). Les enceintes d'essai seront positionnées de façon randomisée dans l'incubateur.

Eau et conditions d'expérimentation

12. Il est recommandé de diluer l'eau d'élevage pour atteindre les niveaux de dureté typiques d'une grande variété d'eaux de surface. On utilisera de l'eau reconstituée pour préparer l'eau de dilution (27). Le degré de dureté obtenu doit être équivalent à 100-300 mg/l de CaCO_3 pour empêcher la précipitation excessive du carbonate de calcium. Il est possible d'utiliser une autre eau de surface ou eau de puits bien caractérisée. On peut adapter l'eau reconstituée pour obtenir une eau d'élevage de faible dureté en la diluant avec de l'eau désionisée selon un rapport de 1:5 maximum jusqu'à atteindre une dureté minimale de 30-35 mg/l de CaCO_3 . L'eau est aérée jusqu'à saturation en oxygène avant l'ajout du produit chimique. Tout au long de l'essai, la température dans les puits doit être maintenue à 26 ± 1 °C. Le pH doit être compris entre 6,5 et 8,5, et ne doit pas varier de plus de 1,5 unité dans cette plage au cours de l'essai. Si on pense que le pH ne restera pas dans cette plage, alors il convient de procéder à un ajustement de pH avant d'initier l'essai. Le pH doit être ajusté de telle façon que la concentration de la solution-mère ne change pas de manière significative et qu'il n'y ait pas de réaction chimique ni de précipitation du produit chimique d'essai. Il est recommandé d'utiliser de l'acide chlorhydrique (HCl) et de l'hydroxyde de sodium (NaOH) pour corriger le pH des solutions contenant le produit chimique d'essai.

Solutions d'essai

13. Des solutions d'essai des concentrations sélectionnées peuvent être préparées, par exemple par dilution d'une solution-mère. Les solutions-mères doivent, de préférence, être préparées par simple mélange ou agitation du produit chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation ou ultrasons, par exemple). Si le produit chimique d'essai se dissout difficilement dans l'eau, on suivra les procédures décrites dans le document d'orientation n° 23 de l'OCDE sur les essais de substances et mélanges difficiles (28). On évitera d'utiliser des solvants; leur usage peut néanmoins se révéler nécessaire dans certains cas pour produire une solution-mère convenablement concentrée. Si un solvant est quand même utilisé pour aider à la préparation de la solution-mère, sa concentration finale ne devra pas dépasser 100 µl/l et devra être identique dans tous les récipients d'essai. En cas d'utilisation d'un solvant, un autre témoin contenant le solvant est nécessaire.

Entretien des poissons géniteurs

14. Un stock de poissons-zèbres reproducteurs sauvages et non exposés, dont le taux de fécondation des œufs est bien documenté, devra être utilisé pour la production des œufs. Les poissons ne doivent pas présenter de symptômes d'infection et de maladie discernables à l'examen macroscopique et ne doivent pas avoir reçu de traitement pharmaceutique (aigu ou prophylactique) au cours des deux mois précédant le frai. Les poissons géniteurs sont maintenus dans des aquariums ayant une capacité de charge recommandée de 1 l d'eau par poisson et une photopériode fixe de 12-16 heures (29)(30)(31)(32)(33). La vitesse de filtration doit être ajustée de façon optimale; des vitesses de filtration excessives provoquant de fortes perturbations de l'eau sont à éviter. En ce qui concerne les conditions d'alimentation, on consultera l'appendice 2. Il convient d'éviter une alimentation trop abondante, et la qualité de l'eau ainsi que la propreté des aquariums devront être contrôlées régulièrement et, si nécessaire, rétablies à l'état initial.

Épreuve de compétence

15. En tant que produit chimique de référence, le 3,4-dichloroaniline [utilisé dans les études de validation (1)(2)] doit être testé dans une gamme complète de concentrations-réponses pour vérifier la sensibilité de la souche de poissons utilisée, de préférence deux fois par an. Les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois devront utiliser la substance de référence. Un laboratoire peut utiliser cette substance pour démontrer sa compétence technique à réaliser l'essai avant de soumettre les données à des fins réglementaires.

Production des œufs

16. Les œufs de poisson-zèbre peuvent être produits *via* des groupes de frai (dans des cuves de frai individuelles) ou *via* un frai de masse (dans les cuves d'entretien). Dans le cas des groupes de frai, les mâles et les femelles (dans un rapport de 2:1, par exemple) d'un groupe reproducteur sont placés dans des cuves de frai pendant quelques heures avant la tombée du jour précédant l'essai. Sachant qu'il se peut que les groupes de frai de poissons-zèbres ne parviennent pas à frayer, il est recommandé d'utiliser en parallèle au moins trois cuves de frai. Pour éviter les biais génétiques, les œufs sont collectés à partir de trois groupes reproducteurs minimum, mélangés et sélectionnés au hasard.
17. Pour la collecte des œufs, des pièges à frai sont placés dans les cuves de frai ou dans les cuves d'entretien avant la tombée du jour précédant l'essai, ou avant les premières lueurs du jour de l'essai. Pour empêcher la prédation des œufs par les poissons-zèbres adultes, on couvre les pièges à frai avec une grille en matériau inerte composée de mailles de taille appropriée (approx. $2 \pm 0,5$ mm). Si cela est jugé nécessaire, des plantes artificielles en matériau inerte (plastique, verre, etc.) peuvent être fixées à la grille pour servir de stimulus de frai (3)(4)(5)(23)(35). On utilisera des matières plastiques patinées et qui ne libèrent pas de substances contaminantes, telles que les phtalates. L'accouplement, le frai et la fécondation ont lieu avant l'expiration d'un délai de 30 minutes à compter de l'apparition des premières lueurs du jour, et les pièges à frai avec les œufs collectés peuvent être retirés délicatement. Il est recommandé de rincer les œufs avec de l'eau reconstituée après le retrait des œufs des pièges à frai.

Différenciation des œufs

18. À 26°C, les œufs fécondés subissent la première segmentation au bout d'une quinzaine de minutes, et les segmentations synchrones consécutives forment 4, 8, 16 et 32 blastomères (voir appendice 3) (35). À ces stades, le développement d'une blastula permet d'identifier clairement les œufs fécondés.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition

19. Vingt embryons par concentration (un embryon par puits) sont exposés au produit chimique d'essai. L'exposition au produit chimique d'essai devrait permettre de maintenir les concentrations d'essai autour de ± 20 % de la concentration nominale pendant la durée de l'essai. Si cela s'avère impossible au cours d'un essai statique, un système de renouvellement semi-statique devra être envisagé (p.ex. avec un renouvellement toutes les 24 heures). Dans ce cas, les concentrations d'exposition devront être vérifiées au minimum à la concentration la plus haute et la concentration la plus basse au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement de la solution (voir paragraphe 36). Si une concentration d'exposition autour de ± 20 % de la concentration nominale ne peut être maintenue, toutes les concentrations d'exposition doivent être mesurées au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement (voir paragraphe 36). Lors du renouvellement, on veillera à ce que les embryons soient toujours recouverts d'une petite quantité d'anciennes solutions d'essai pour éviter leur dessiccation. Il est possible d'adapter le protocole de l'essai pour respecter les exigences applicables aux essais de produits chimiques spécifiques [par exemple, systèmes de dosage dynamiques (24) ou passifs (25) pour les produits chimiques facilement dégradables ou hautement adsorbants (29), ou autres systèmes pour les produits chimiques volatiles (37)(38)]. Dans tous les cas, on veillera à stresser le moins possible les embryons. Les enceintes d'essai doivent être conditionnées avec les solutions d'essai pendant au moins 24 h avant le lancement de l'essai. Les conditions d'essai sont résumées à l'appendice 2.

Concentrations d'essai

20. Pour répondre aux exigences statistiques, on doit normalement utiliser cinq concentrations du produit chimique d'essai espacées d'un facteur constant ne dépassant pas 2,2. Si l'on utilise moins de cinq concentrations, on doit fournir une justification. La plus forte concentration testée devrait engendrer de préférence une létalité de 100 % tandis que la plus faible concentration testée ne devrait engendrer aucun effet observable, tel que défini au paragraphe 28. Le fait de procéder à un essai de détermination de l'ordre de grandeur avant l'essai définitif permettra de sélectionner la plage de concentrations appropriée. La détermination de l'ordre de grandeur est généralement faite au moyen de 10 embryons par concentration. Selon les instructions ci-dessous, on doit procéder à l'essai en utilisant des plaques à 24 puits. Si l'on utilise différentes enceintes d'essai (petites boîtes de Pétri, par exemple) ou si l'on teste un plus grand nombre de concentrations, les instructions doivent être adaptées en conséquence.

21. On trouvera au paragraphe 27 et à la figure 1 de l'appendice 4 des informations détaillées et des instructions visuelles concernant la répartition des concentrations dans les plaques à 24 puits.

Témoins

22. Les puits témoins contenant l'eau de dilution doivent servir à la fois de témoins négatifs et de témoins à l'intérieur d'une plaque. Si l'on observe que plus d'un embryon est mort dans le témoin de la plaque, la plaque est rejetée, ce qui réduit le nombre de concentrations utilisées pour déduire la CL_{50} . En cas de rejet d'une plaque entière, la capacité à évaluer et à discerner les effets observés peut devenir plus difficile, en particulier si la plaque rejetée est celle contenant le témoin solvant ou une plaque dans laquelle les embryons traités sont également touchés. Dans le premier cas, l'essai doit être répété. Dans le second cas, la perte de la totalité d'un ou de plusieurs groupe(s) de traitement en raison de la mortalité dans la plaque témoin peut restreindre la possibilité d'évaluer les effets et de déterminer la valeur de la CL_{50} .
23. Un témoin positif à une concentration fixe de 4 mg/l de 3,4-dichloroaniline est prévu pour chaque lot d'œufs utilisé pour l'essai.
24. Si un solvant est utilisé, un groupe supplémentaire de 20 embryons est exposé au solvant sur une plaque à 24 puits séparée, qui sert ainsi de témoin solvant. Pour que l'essai soit considéré comme acceptable, on doit démontrer que le solvant n'a pas d'effets significatifs sur le temps d'éclosion ni sur la survie et qu'il ne produit pas d'autres effets néfastes sur les embryons (cf. paragraphe 7c).

Début de l'exposition et durée de l'essai

25. L'essai démarre dès que possible après que la fécondation des œufs et se termine après 96 h d'exposition. Les embryons doivent être immergés dans les solutions d'essai avant le début de la segmentation du blastodisque ou, au plus tard, avant l'étape des 16 cellules. Pour que l'exposition démarre aussitôt que possible, on sélectionne au moins deux fois le nombre d'œufs nécessaires par groupe de traitement et on les répartit au hasard dans les concentrations et témoins respectifs (exemple: sur des plaques de cristallisation de 100 ml; les œufs doivent être recouverts entièrement) au plus tard 90 minutes après fécondation.
26. Les œufs fécondés viables doivent être séparés des œufs non fécondés puis transférés vers les plaques à 24 puits pré-conditionnées pendant 24 h et remplies de nouveau avec 2 ml/puits de solutions d'essai dans un délai de 180 minutes après la fécondation. On utilise un stéréomicroscope (permettant de préférence un grossissement $\geq 30\times$) pour sélectionner des œufs fécondés en phase de segmentation et sans trace d'irrégularités flagrantes lors de la segmentation (asymétrie, formation de vésicules, etc.) ni de lésions du chorion. En ce qui concerne la collecte et la séparation des œufs, on consultera les figures 1 et 3 de l'appendice 3 ainsi que la figure 2 de l'appendice 4.

Répartition des œufs sur les plaques à 24 puits

27. Les œufs sont répartis comme suit sur les plaques à puits (voir également la figure 1 de l'appendice 4)
- 20 œufs sur une plaque pour chaque concentration d'essai;
 - 20 œufs servant de témoin solvant sur une plaque (si nécessaire);
 - 20 œufs servant de témoin positif sur une plaque;
 - 4 œufs immergés dans l'eau de dilution, servant de témoin interne à la plaque, sur chacune des plaques ci-dessus;
 - 24 œufs immergés dans l'eau de dilution, servant de témoin négatif sur une plaque.

Observations

28. Les observations apicales faites sur chaque embryon d'essai portent sur: la coagulation des embryons, l'absence de formation de somites, le non-détachement de la queue, l'absence de battements du cœur (tableau 1). Ces observations servent à déterminer la létalité: si l'une des ces observations donne un résultat positif, cela signifie que l'embryon de poisson-zèbre est mort. De plus, l'éclosion est enregistrée chaque jour dans les groupes de traitement et les groupes témoins à partir de 48 h. Les observations sont enregistrées toutes les 24 h, jusqu'à la fin de l'essai.

Tableau 1

Observations apicales de la toxicité aiguë chez les embryons de poisson-zèbre 24 à 96 h après fécondation

| | Durées d'exposition | | | |
|---------------------------------|---------------------|------|------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| Embryons coagulés | + | + | + | + |
| Absence de formation de somites | + | + | + | + |
| Non-détachement de la queue | + | + | + | + |
| Absence de battements du cœur | | + | + | + |

29. *Coagulation de l'embryon*: Les embryons coagulés sont d'un blanc laiteux et apparaissent sombres au microscope (voir la figure 1 de l'appendice 5). Le nombre d'embryons coagulés est déterminé au bout de 24, 48, 72 et 96 h.
30. *Absence de formation de somites*: À $26 \pm 1^\circ\text{C}$, une vingtaine de somites se forment au bout de 24 h (voir la figure 2 de l'appendice 5) chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement. Un embryon normalement développé a des mouvements spontanés (contractions des deux côtés). Ces mouvements spontanés indiquent la formation de somites. L'absence de somites est enregistrée au bout de 24, 48, 72 et 96 h. La non-formation de somites au bout de 24 h peut être due à un retard général de développement. Au bout de 48 h au plus tard, la formation de somites devrait avoir rattrapé son retard. Si ce n'est pas le cas, les embryons sont considérés comme morts.
31. *Non-détachement de la queue*: Chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement, le détachement de la queue (voir la figure 3 de l'appendice 5) du vitellus est observé après elongation postérieure du corps embryonnaire. L'absence de détachement de la queue est enregistrée au bout de 24, 48, 72 et 96 h.
32. *Absence de battements du cœur*: Chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement, à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, les battements du cœur sont visibles au bout de 48 h (voir la figure 4 de l'appendice 5). On sera particulièrement vigilant au moment de noter ce paramètre; en effet, des battements du cœur irréguliers (erratiques) ne doivent pas être enregistrés comme létaux. De plus, des battements de cœur visibles sans circulation dans l'aorte abdominale sont considérés comme non létaux. Pour noter ce paramètre, on doit avoir observé des embryons ne montrant pas de battement du cœur avec un grossissement supérieur ou égal à $80\times$ pendant au moins une minute. L'absence de battements du cœur est enregistrée au bout de 48, 72 et 96 h.
33. Les taux d'éclosion de tous les groupes de traitement et les groupes témoins doivent être enregistrés à compter de l'expiration d'un délai de 48 h puis notés dans le rapport. Bien que l'éclosion ne soit pas utilisée pour le calcul de la CL_{50} , elle assure l'exposition de l'embryon sans la fonction de barrière que peut jouer le chorion, et à ce titre elle peut aider à l'interprétation des données.
34. On trouvera dans les appendices 3 et 5 une description détaillée du développement normal (36) et des exemples de développement anormal des embryons de poisson-zèbre.

Dosages analytiques

35. Au début et à la fin de l'essai, on mesure le pH, la dureté totale et la conductivité dans le(s) témoin(s) et dans la concentration d'essai maximale. Dans les essais semi-statiques (essais avec renouvellement), on doit mesurer le pH avant et après le renouvellement de l'eau. La concentration d'oxygène dissous est mesurée à la fin de l'essai dans les témoins négatifs et dans la concentration d'essai maximale avec des œufs viables; les résultats doivent répondre aux critères de validité de l'essai (voir le paragraphe 8f). Si l'on craint que la température ne soit pas la même dans toutes les plaques 24 puits, la température sera mesurée dans trois cuves sélectionnées au hasard. On doit enregistrer la température de préférence en continu au cours de l'essai ou, du moins, quotidiennement.
36. Dans un système statique, la concentration du produit chimique d'essai doit être mesurée au moins à la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai, mais de préférence dans tous les traitements, au début et à la fin de l'essai. Dans un système d'essai semi-statique (avec renouvellement) où la concentration du produit chimique d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales, il est recommandé d'analyser au moins la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai juste après leur préparation et immédiatement avant le renouvellement. Si l'on prévoit que la concentration du produit chimique d'essai s'écartera de plus de 20 % des valeurs nominales, il faut analyser toutes les concentrations d'essai fraîchement préparées et avant le renouvellement de la solution. Si le volume à analyser est insuffisant, il peut se révéler utile de fusionner les solutions d'essai ou d'avoir recours à des enceintes de substitution fabriquées dans le même matériau et ayant les mêmes rapports du volume à la surface que les plaques à 24 puits. Il est vivement recommandé que les résultats soient basés sur les concentrations mesurées. Si les concentrations s'écartent de 80-120 % de la valeur nominale, il faut exprimer les concentrations avec effet par rapport à la moyenne géométrique des concentrations mesurées dans les essais semi-statiques; pour de plus amples informations, voir le chapitre 5 du document d'orientation de l'OCDE «Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures» (28).

ESSAI LIMITE

37. Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente méthode d'essai, un essai limite peut être conduit à 100 mg/l du produit chimique d'essai ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus basse), de façon à démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration. On devra placer 20 embryons dans le traitement, le témoin positif et, si nécessaire, le témoin solvant ainsi que 24 embryons dans le témoin négatif. Si le pourcentage de létalité à la concentration testée dépasse de 10 % la mortalité dans le témoin négatif (ou le témoin solvant), on doit procéder à une étude complète. Les effets observés doivent être enregistrés. Si la mortalité dépasse 10 % dans le témoin négatif (ou le témoin de solvant), l'essai n'est plus valable et doit être recommencé.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

38. Dans cet essai, chaque puits est considéré comme un réplicat indépendant pour l'analyse statistique. Les pourcentages d'embryons pour lesquels au moins l'une des observations apicales est positive au bout de 48 et/ou 96 h sont représentés graphiquement en fonction des concentrations d'essai. Pour le calcul des pentes de la courbe, des valeurs de la CL_{50} et des limites de confiance (95 %), on appliquera les méthodes statistiques appropriées (39) et on consultera le document d'orientation de l'OCDE Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (39).

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai:

Substance mono-constituant

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisée, autant que possible p.ex. par l'identité chimique des constituants voir-ci-dessus, la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Organismes d'essai:

- nom scientifique, souche, origine, méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

Conditions d'expérimentation:

- méthode utilisée (par exemple semi-statique/avec renouvellement);
- photopériode;
- protocole de l'essai (nombre d'enceintes d'essai, types de témoins, etc.);
- caractéristiques de l'eau pour l'entretien des poissons (pH, dureté, température, conductivité, oxygène dissous, etc.);
- concentration d'oxygène dissous, pH, dureté totale, température et conductivité des solutions d'essai au début de l'essai et au bout de 96 h);
- méthode de préparation des solutions-mères et des solutions d'essai, ainsi que fréquence du renouvellement;
- justification de l'emploi d'un solvant et justification de son choix, s'il ne s'agit pas de l'eau;
- concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les cuves d'essai; on notera également dans le rapport le rendement de récupération de la méthode et sa limite de quantification (LQ);
- preuve que les témoins ont répondu aux critères de validité applicables au taux global de survie;
- taux de fécondation des œufs;
- taux d'éclosion dans les groupes de traitement et les groupes témoins.

Résultats:

- la plus forte concentration ne provoquant aucune mortalité durant l'essai;
- la plus faible concentration provoquant 100 % de mortalité durant l'essai;
- la mortalité cumulée pour chaque concentration aux moments d'observation recommandés;
- les valeurs de la CL_{50} à 96 h (éventuellement à 48 h) en ce qui concerne la mortalité, avec des intervalles de confiance de 95 %, si possible;
- un graphique représentant la courbe concentration-mortalité à la fin de l'essai;
- la mortalité dans les témoins (témoins négatifs, témoins à l'intérieur d'une plaque, témoin positif et, le cas échéant, témoin de solvant);
- les données sur le résultat de chacune des quatre observations apicales;
- l'incidence et la description des anomalies morphologiques et physiologiques, s'il y a lieu (voir les exemples de la figure 2, appendice 5);
- les incidents survenus au cours de l'essai et qui ont pu influencer sur les résultats;

- l'analyse statistique et le traitement des données (analyse probit, modèle de régression logistique et moyenne géométrique des valeurs de la CL_{50});
- la pente et les limites de confiance du modèle de régression de la courbe concentration-réponse (transformée).

Écarts éventuels par rapport à la présente méthode d'essai et explications correspondantes.

Discussion et interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 157, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (annexes). Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 179, OCDE, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. *ALTEX* 22: 87-102.
- (4) ISO (2007), Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*). ISO 15088:2007, Organisation internationale de normalisation.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. *ATLA* 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9690-9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol. In Vitro* 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1768-1783. .

- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196–209
- (17) Chapitre C.4 de la présente annexe: Biodégradabilité facile.
- (18) Chapitre C.29 de la présente annexe: Biodégradabilité facile, dégagement de CO₂ dans des flacons hermétiquement clos.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
- (23) Chapitre C.48 de la présente annexe: Essai à court terme de reproduction des poissons. Voir appendice 4A.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097–4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
- (27) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996), Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae)] – Partie 3: Méthode avec renouvellement continu. [<http://www.iso.org>].
- (28) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Série sur les essais et l'évaluation n° 23, ENV/JM/MONO(8200)6, OCDE, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5^{ème} édition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Conseil canadien de protection des animaux (2005), Lignes directrices du CCPA sur: le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Commission européenne (2007), Recommandation de la Commission du 18 juin 2007 concernant des lignes directrices relatives à l'hébergement et aux soins des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (notifiée sous le numéro C(2007) 2525) (2007/526/CE) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF>]
- (33) Union européenne (2010), Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Journal officiel de l'Union européenne, L 276:33-79; 20.10.2010

- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.
- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.
- (36) Chapitre C.2 de la présente annexe *Daphnia* sp., Essai d'immobilisation immédiate.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978
- (38) ISO (Organisation internationale de normalisation) (2006), Qualité de l'eau – Lignes directrices relatives à l'interprétation statistique de données écotoxicologiques. Available: [<http://www.iso.org>].
- (39) OCDE (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.
-

Appendice 1

DEFINITIONS

Effet apical: ayant des effets au niveau de la population.

Blastula: formation cellulaire autour du pôle animal, qui recouvre une certaine partie du vitellus.

Produit chimique: une substance ou un mélange

Épibolie: prolifération massive de cellules principalement épidermiques lors de la phase de gastrulation de l'embryon et mouvement de ces cellules de la face dorsale vers la face ventrale, par lequel les couches de cellules entodermiques s'invaginent et le vitellus se retrouve à l'intérieur de l'embryon.

Essai dynamique: essai avec un flux continu de solutions d'essai dans le système d'essai pendant toute la durée de l'exposition.

Témoin à l'intérieur d'une plaque: témoin interne constitué de quatre puits remplis d'eau de dilution par plaque à 24 puits afin d'identifier la contamination potentielle des plaques par le fabricant ou par le chercheur au cours du protocole, et tout effet de la plaque pouvant influencer sur le résultat de l'essai (gradient de température, par exemple).

IUPAC: Union internationale pour la chimie pure et appliquée.

Eau d'élevage: eau dans laquelle est pratiqué l'élevage des poissons adultes.

Concentration létale médiane (LC₅₀): concentration d'un produit chimique d'essai qui devrait provoquer la mort de 50 % des animaux exposés au cours de l'essai.

Essai semi-statique (essai avec renouvellement): essai avec renouvellement régulier des solutions d'essai à l'issue de périodes définies (toutes les 24 h, par exemple).

SMILES: Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée

Somite: chez les vertébrés au stade de développement embryonnaire, les somites sont des masses mésodermiques situées de part et d'autre du tube neural, qui produiront ensuite le derme (dermatome), les muscles squelettiques (myotome) et les vertèbres (sclérotome).

Essai statique: essai dans lequel les solutions d'essai restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Appendice 2

**ENTRETIEN, ELEVAGE ET CONDITIONS TYPES POUR LES ESSAIS DE TOXICITE AIGÛE SUR
EMBRYONS DE POISSON-ZEBRES**

| Poisson-zèbre (<i>Danio rerio</i>) | | |
|--|--|---|
| Origine de l'espèce | Inde, Birmanie, Malacca, Sumatra | |
| Dimorphisme sexuel | Femelles: ventre proéminent lorsqu'elles portent des œufs Mâles: plus sveltes, teinte orangée entre les rayures bleues longitudinales (particulièrement visible sur la nageoire anale) | |
| Régime alimentaire | Flocons déshydratés (max. 3 % du poids des poissons par jour) 3-5 fois par jour + nauplies d'artémies (du genre <i>Artemia</i>) et/ou daphnies de taille appropriée provenant d'une source non contaminée. Les petits crustacés sont une source d'enrichissement de l'environnement et doivent donc faire partie du régime alimentaire, si possible. Pour une qualité de l'eau optimale, les aliments non consommés et les fèces doivent être retirés une heure environ après le repas. | |
| Poids approximatif des poissons adultes | Femelles: 0,65 ± 0,13 g Mâles: 0,5 ± 0,1 g | |
| Entretien des poissons géniteurs parental fish | Intensité de l'éclairage | Ampoules fluorescentes (à large spectre); 10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire); photopériode: 12-16 h |
| | Température de l'eau | 26 ± 1 °C |
| | Qualité de l'eau | O ₂ ≥ 80 % de la valeur de saturation, dureté: par exemple, ~ 30-300 mg/l de CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤ 48mg/l, NH ₄ ⁺ et NO ₂ ⁻ : < 0,001 mg/l, chlore résiduel < 10 µg/l, chlore organique total < 25 ng/l, pH = 6,5-8,5 |
| | Autres critères de qualité de l'eau | Particules < 20 mg/l, carbone organique total < 2 mg/l, pesticides organophosphorés totaux < 50 ng/l, pesticides organochlorés totaux et biphenyles polychlorés < 50 ng/l |
| | Contenance des cuves d'entretien | 180 l, 1 poisson/l, par exemple |
| | Purification de l'eau | Permanente (avec filtres à charbon); autres possibilités: combinaisons avec un système d'entretien avec renouvellement semi-statique ou avec un système dynamique avec renouvellement de l'eau en continu |
| | Rapport mâles/femelles recommandé pour l'élevage | 2:1 (ou frai de masse) |
| Cuves de frai | Par exemple, cuves de 4 l avec fond grillagé en acier et plantes artificielles servant de stimulant pour le frai; coussins chauffants extérieurs, ou frai de masse à l'intérieur des cuves d'entretien. | |
| Structure et apparence des œufs | Chorion stable (soit très transparent, non collant, diamètre d'environ 0,8-1,5 mm) | |
| Taux de frai | Une femelle à maturité fraie au moins 50-80 œufs par jour. Chez certaines souches, les taux de frai peuvent être beaucoup plus élevés. Le taux de fécondation doit être ≥ 70 %. Dans le cas de poissons frayant pour la première fois, les taux de fécondation des œufs peuvent être plus faibles lors des premiers frais. | |
| Type d'essai | Statique, semi-statique avec renouvellement, dynamique, 26 ± 1 °C, enceintes d'essai conditionnées pendant 24 h (plaques à 24 puits avec 2,5-5 ml par cavité, par exemple) | |

Appendice 3

DEVELOPPEMENT NORMAL DU POISSON-ZEBRE A 26°C

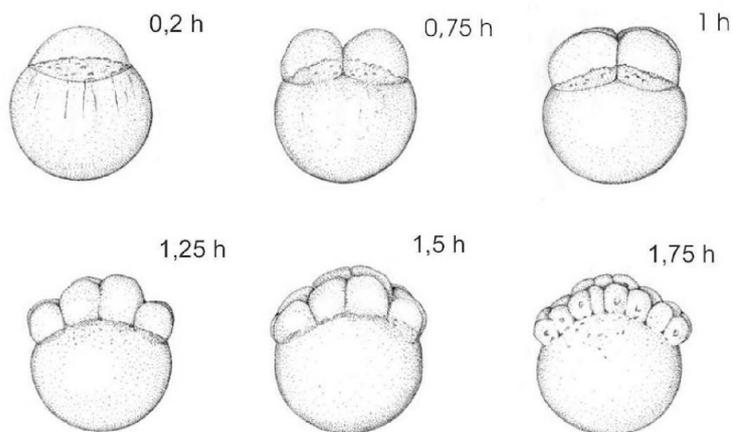


Fig. 1: Sélection de premiers stades de développement du poisson-zèbre (*Danio rerio*): 0,2–1,75 h après la fécondation (Kimmel *et al.*, 1995). On peut utiliser la succession dans le temps des différents stades de développement normal pour diagnostiquer à la fois la fécondation et la viabilité des œufs (voir le paragraphe 25: Sélection des œufs fécondés).

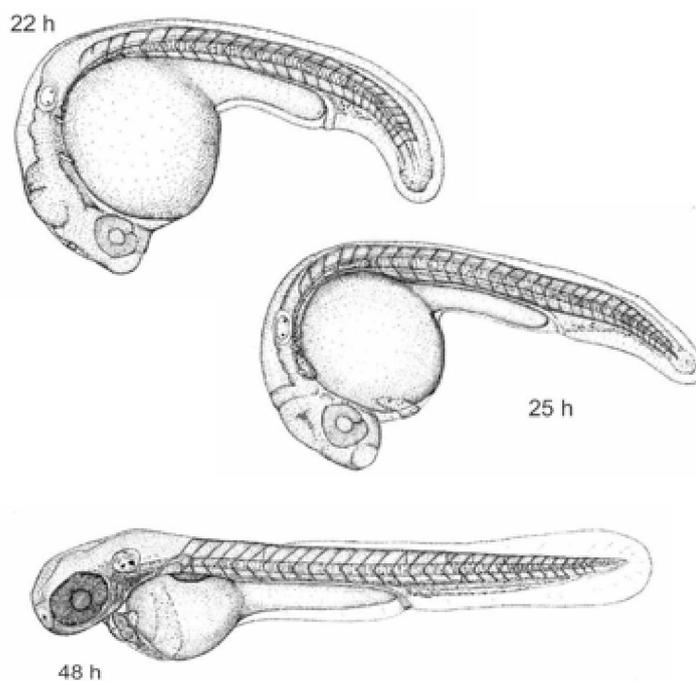


Fig. 2: Sélection de derniers stades de développement du poisson-zèbre (*Danio rerio*) (embryon déchorioné pour une meilleure visibilité): 22–48 h après la fécondation (Kimmel *et al.*, 1995).

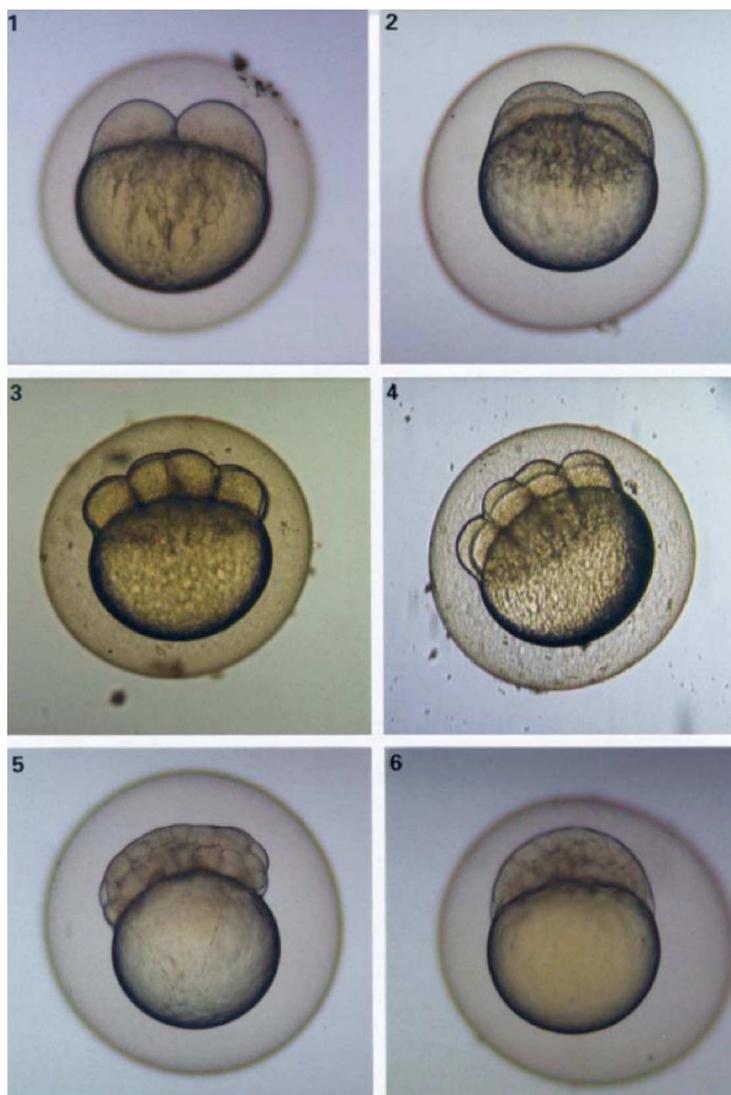
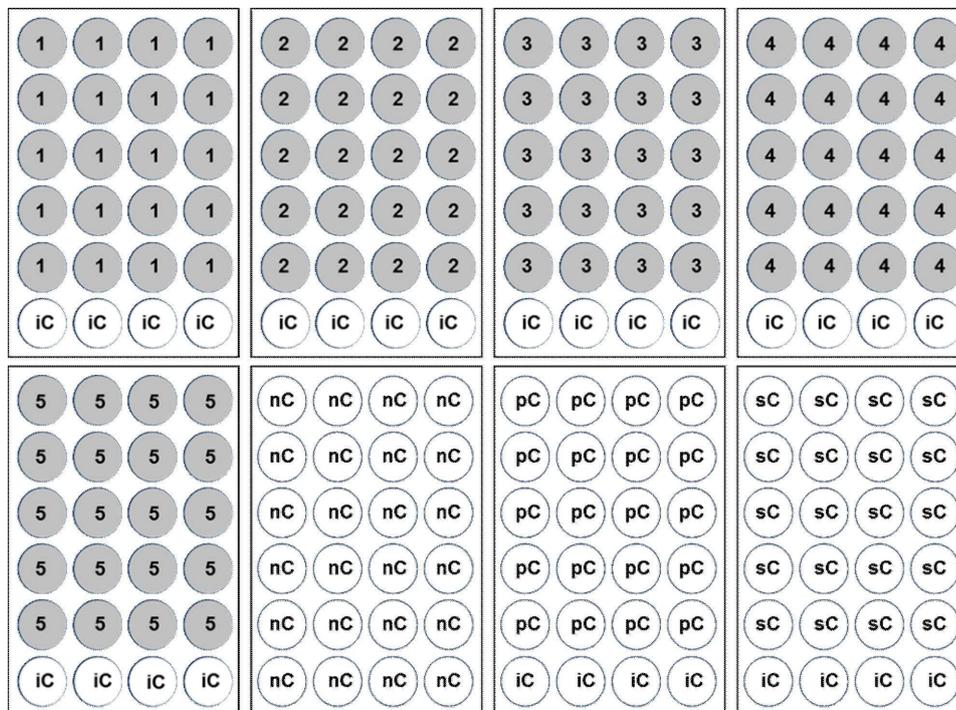


Fig. 3: Développement normal d'un poisson-zèbre (*Danio rerio*) au stade embryonnaire: (1) 0,75 h, stade à 2 cellules; (2) 1 h, stade à 4 cellules; (3) 1,2 h, stade à 8 cellules; (4) 1,5 h, stade à 16 cellules; (5) 4,7 h, début de l'épibolie; (6) 5,3 h, épibolie à 50 % environ [Braunbeck & Lammer 2006 (40)].

Appendice 4

Fig. 1

Plan des plaques 24 puits



1-5 = cinq concentrations d'essai/produit chimique;

nC = témoin négatif (eau de dilution);

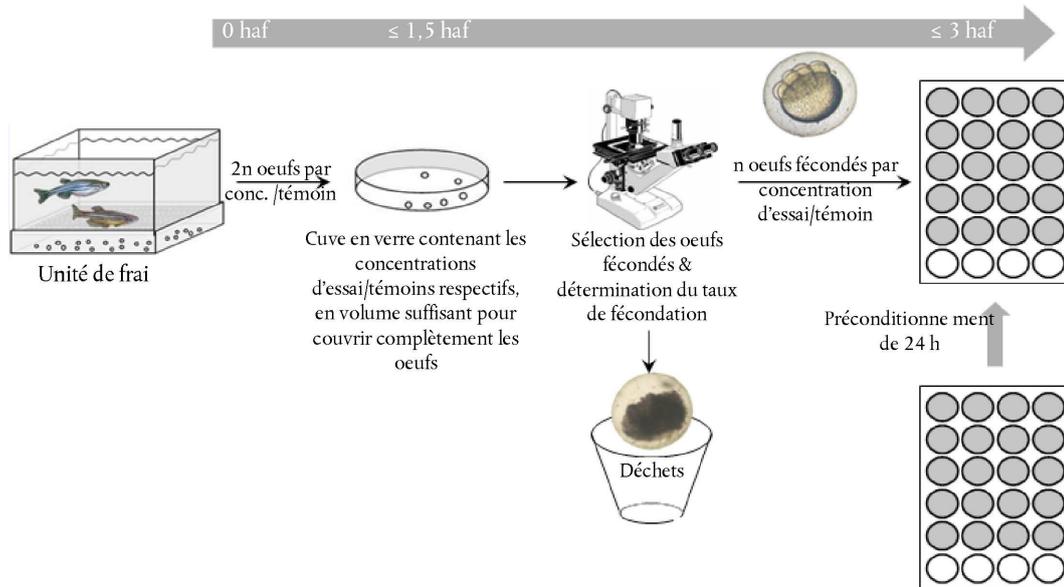
iC = témoin à l'intérieur d'une plaque (eau de dilution);

pC = témoin positif (3,4-DCA: 4 mg/l);

sC = témoin de solvant

Fig. 2

Schéma du protocole des essais de toxicité chez le poisson-zèbre au stade embryonnaire (de gauche à droite): production d'œufs, collecte des œufs, pré-exposition immédiatement après la fécondation dans des cuves en verre, sélection des œufs fécondés au moyen d'un microscope inversé ou binoculaire et répartition des œufs fécondés sur des plaques à 24 puits préparées avec les concentrations d'essai/témoins respectifs, n = nombre d'œufs nécessaires par concentration d'essai/témoin (20 en l'occurrence), haf = heures après fécondation.

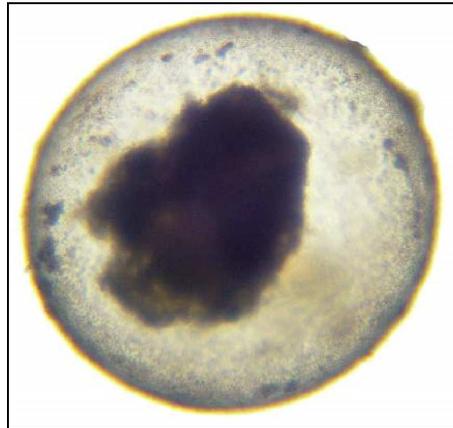


Appendice 5

ATLAS DES PARAMETRES LETAUX POUR L'ESSAI DE TOXICITE CHEZ LE POISSON-ZEBRE AU STADE EMBRYONNAIRE

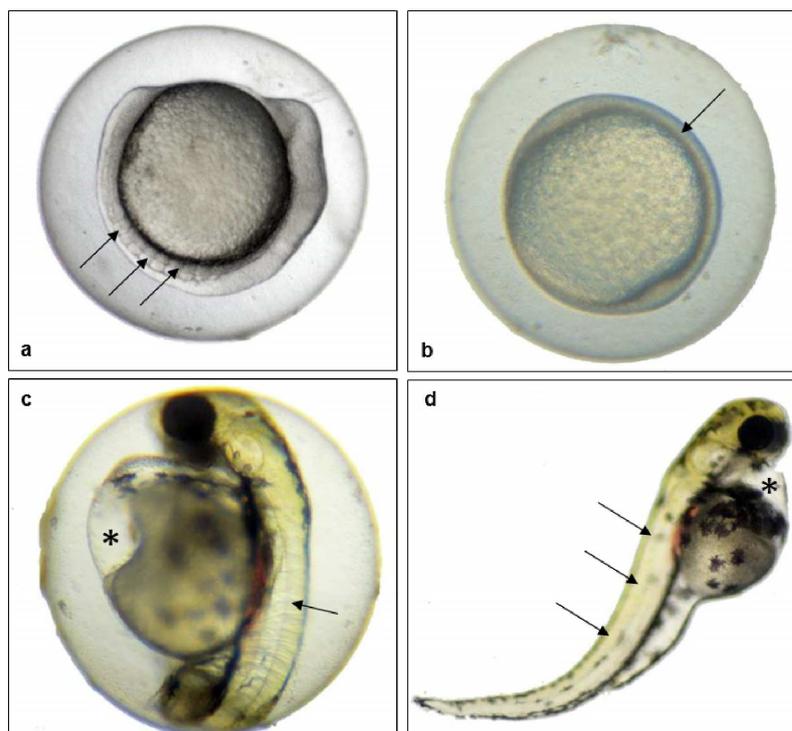
Les paramètres apicaux ci-dessous donnent des indications sur la toxicité aiguë et, par conséquent, la mort des embryons: *coagulation de l'embryon, non-détachement de la queue, absence de formation de somites et absence de détection de battements du cœur*. Les micrographies ci-dessous ont été sélectionnées pour illustrer ces paramètres.

Fig. 1

Coagulation de l'embryon:

Par éclairage sur fond clair, on distingue diverses inclusions opaques sur les embryons de poisson-zèbre coagulés.

Fig. 2

Absence de formation de somites

Malgré un retard de développement de 10 h environ, l'embryon de poisson-zèbre de 24 h a des somites bien développées (→) en (a) tandis qu'il ne montre aucun signe de formation de somites (→) en (b). On observe la formation de somites bien distinctes (→) chez l'embryon de poisson-zèbre de 48 h en (c) malgré un œdème prononcé du sac vitellin (*) tandis qu'en (d) l'embryon de poisson-zèbre de 96 h ne montre aucun signe de formation de somites (→). On note également la déviation de la colonne vertébrale (scoliose) et l'œdème péricardique (*) chez l'embryon en (d).

Fig. 3

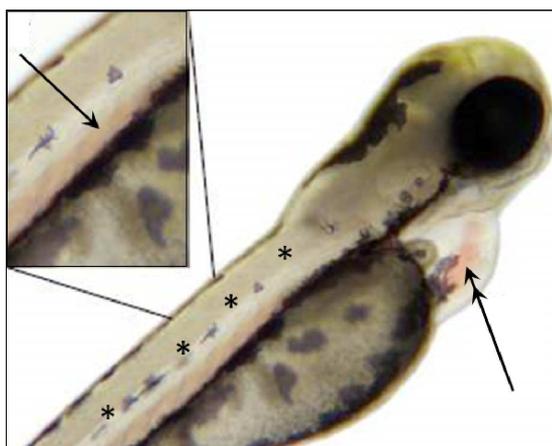
Vue latérale du non-détachement du bourgeon caudal



(a: →; embryon de poisson-zèbre de 96 h). On note également l'absence de vésicule optique (*).

Fig. 4

L'absence de battements du cœur



L'absence de battements du cœur est, par définition, difficile à illustrer au moyen d'une micrographie. La non-convulsion du cœur (double flèche) indique l'absence de battements du cœur. L'immobilité des cellules sanguines, par exemple dans l'aorte abdominale (→ dans l'encadré) n'est pas un indicateur d'absence de battements du cœur. On notera également l'absence de formation de somites dans cet embryon (*, apparence homogène plutôt que segmentaire des tissus musculaires). L'observation pour l'enregistrement d'une absence de battements du cœur doit durer au moins une minute, avec un grossissement supérieur ou égal à 80×.

C.50 Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 238 (2014) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle a pour objet d'évaluer la toxicité de produits chimiques sur *Myriophyllum spicatum*, espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des Myriophylles. Elle s'inspire d'une méthode d'essai existante de l'ASTM (1), modifiée pour disposer d'un système sans sédiment (2) afin d'estimer l'écotoxicité intrinsèque des produits chimiques d'essai (quelle que soit la manière dont ces produits chimiques se répartissent entre l'eau et le sédiment). Un système d'essai sans sédiment est peu complexe à analyser (il n'y a qu'une phase aqueuse), et les résultats peuvent être analysés parallèlement et/ou par rapport à ceux obtenus dans l'essai sur les espèces du genre *Lemna* (3). En outre, dans les conditions stériles requises, il est possible de minimiser les effets liés aux micro-organismes et aux algues (dégradation/absorption du produit chimique d'essai, etc.). Cet essai ne remplace pas les autres essais de toxicité aquatique, mais doit les compléter de manière à permettre une évaluation plus complète des dangers et des risques pour la flore aquatique. La méthode d'essai a été validée par un essai circulaire (4).
2. Les modes opératoires avec renouvellement (essai semi-statique) et sans renouvellement (essai statique) de la solution d'essai sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, la méthode semi-statique est conseillée, notamment pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, adsorption, photodégradation, hydrolyse, précipitation ou biodégradation. La référence (5) donne des indications supplémentaires. La présente méthode d'essai s'applique aux substances, qui peuvent être testées soit isolément, cas pour lequel la méthode d'essai a été validée, comme l'indique le rapport de l'essai circulaire (4), soit aux préparations ou mélanges connus. Si l'on teste un mélange, il convient d'en identifier et quantifier les composants dans toute la mesure du possible. La méthode d'essai sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment complète l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment (6). Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données dans une perspective réglementaire, on examinera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Des cultures de *Myriophyllum spicatum* en développement continu (uniquement dans le milieu d'Andrews modifié, voir appendice 2) sont mises en présence de différentes concentrations du produit chimique d'essai pendant 14 jours dans un système d'essai sans sédiment, sous forme de monocultures. L'essai vise à quantifier les effets du produit chimique sur le développement végétatif pendant cette période, d'après l'évaluation d'une série de variables de mesure. Ces variables sont la croissance de la longueur de la tige, celle des branches latérales et des racines et l'évolution des poids frais et sec ainsi que l'augmentation du nombre de verticilles. Par ailleurs, l'essai tient compte de modifications qualitatives particulières chez les organismes d'essai, telles qu'une malformation, une chlorose et une nécrose indiquées par un jaunissement ou une coloration blanche et brune. Pour quantifier les effets imputables au produit chimique, la croissance observée dans les solutions d'essai est comparée aux valeurs déterminées chez les témoins et la concentration induisant un pourcentage donné d'inhibition de la croissance est déterminée et exprimée en termes de CE_x , où «x» peut correspondre à n'importe quelle valeur exigée par la réglementation, par exemple CE_{10} , CE_{20} et CE_{50} . Notons que les estimations de la CE_{10} et de la CE_{20} ne sont fiables et appropriées que dans les essais où les coefficients de variation établis pour les plantes témoins sont inférieurs au niveau d'effet recherché; pour la CE_{20} , cela signifie que ces coefficients de variation doivent rester sous la barre des 20 %.
4. On détermine le taux de croissance spécifique moyen (estimé à partir de la longueur de la tige principale et la mesure de trois autres variables) ainsi que le rendement (estimé à partir de l'accroissement de la tige principale et la mesure de trois autres variables) chez les plantes témoins et les plantes traitées. Le taux de croissance spécifique (t) et le rendement (r) sont ensuite utilisés pour déterminer la C_xE_t (par exemple $C_{10}E_t$, $C_{20}E_t$, $C_{50}E_t$) et la C_xE_r (par exemple, $C_{10}E_r$, $C_{20}E_r$, $C_{50}E_r$).
5. En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

6. Il conviendrait de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier le produit chimique d'essai dans le milieu d'essai. Parmi les données sur le produit chimique d'essai qui pourraient servir à établir les conditions expérimentales figurent la formule structurale, la pureté et les impuretés, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, la constante d'acidité (pK_a), le coefficient de partition octanol-eau (K_{oc}), la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de produit chimique d'essai risquent de se produire durant l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières pour limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité du/des produit(s) chimique(s) d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu expérimental ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai.
7. Il est particulièrement important de maîtriser le pH du milieu d'essai, notamment pour tester des métaux ou des produits chimiques sensibles à l'hydrolyse. Un document d'orientation de l'OCDE (5) fournit de plus amples informations supplémentaires pour les essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques du produit chimique.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour garantir la validité de l'essai, il faut que la longueur de la tige principale soit multipliée par deux en moins de 14 jours dans le groupe témoin. Si l'on fait appel aux milieux et aux conditions expérimentales décrits dans la présente méthode d'essai, ce critère peut être satisfait en régime statique ou semi-statique.
9. Dans les cultures témoins, le coefficient de variation moyen du rendement basé sur la mesure du poids frais de la tige (entre le début et la fin de l'essai) et d'autres variables de mesure (voir paragraphe 37) ne doit pas dépasser 35 % entre les répliqués.
10. Plus de 50 % des répliqués du groupe témoin sont maintenus stériles pendant les 14 jours d'exposition; on ne doit donc pas y observer de contamination par d'autres organismes comme des algues, des champignons ou des bactéries (la solution doit être limpide). *Note*: Le rapport de l'essai circulaire (4) fournit des indications sur la façon d'évaluer la stérilité.

PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

11. Un ou plusieurs produits chimiques de référence, comme le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire (4), peuvent servir à vérifier la procédure d'essai: sur la base des résultats de l'essai circulaire, les valeurs moyennes de CE_{50} du 3,5-DCP pour les différentes variables de réponse (voir paragraphes 37-41 de la présente méthode d'essai) sont comprises entre 3,2 mg/l et 6,9 mg/l (pour les précisions concernant l'intervalle de confiance pour ces valeurs, voir le rapport de l'essai circulaire). Il est conseillé de tester le produit chimique de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est conduit moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité du produit chimique d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

12. Tout le matériel entrant en contact avec les milieux d'essai doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et nettoyée de tous les contaminants chimiques risquant d'être relargués dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment longs pour que la tige des plantes témoins puisse se développer dans la phase aqueuse sans en atteindre la surface à la fin de l'essai. Il est conseillé d'utiliser des tubes à essai en verre borosilicaté à parois épaisses et à bords droits, d'un diamètre interne d'environ 20 mm et d'une longueur proche de 250 mm, et munis de bouchons en aluminium.
13. Étant donné que le milieu d'Andrews modifié contient du sucre (qui stimule la croissance des champignons et des bactéries), les solutions d'essai sont préparées en conditions stériles. L'ensemble des liquides et du matériel expérimental est stérilisé avant utilisation. Cette stérilisation est effectuée par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou durant 20 minutes en autoclave à 121 °C. D'autre part, tous les récipients, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

14. Les récipients d'essai et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. L'éclairage et la température doivent être contrôlables et maintenus à un niveau constant.

Organisme d'essai

15. *Myriophyllum spicatum* est une espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des Myriophylles. Entre juin et août, elle produit de discrètes fleurs roses et blanches qui pointent à la surface de l'eau. Les plantes sont enracinées dans le sol grâce à un système de rhizomes robustes. Elles poussent dans tout l'hémisphère nord dans des eaux stagnantes eutrophiques mais non polluées et plutôt calcifères qui contiennent un substrat boueux. *Myriophyllum spicatum* préfère les eaux douces, mais se trouve aussi en eau saumâtre.
16. L'essai de toxicité dans un système sans sédiment fait appel à des plantes stériles. Si le laboratoire d'essai n'a pas l'habitude de cultiver *Myriophyllum spicatum*, il peut s'approvisionner en matériel végétal stérile auprès d'un autre laboratoire; il est aussi possible de prélever des spécimens dans la nature ou de les acheter dans le commerce, mais le matériel végétal ne sera pas stérile. Si les myriophylles sont prélevés dans la nature, il faut vérifier qu'il s'agit du taxon souhaité. Les plantes obtenues dans la nature ou le commerce doivent être stérilisées (1) et cultivées dans le même milieu que celui de l'essai pendant au moins huit semaines avant l'utilisation. Les sites naturels où sont prélevées les cultures de départ seront exempts de sources de contamination manifestes. Lors des prélèvements de *Myriophyllum spicatum* dans la nature, il faut très minutieusement veiller à collecter l'espèce voulue, en particulier dans les régions où ce taxon peut former des hybrides avec d'autres Myriophylles. Si c'est un autre laboratoire qui fournit les végétaux, ces derniers sont cultivés dans des conditions similaires pendant au moins trois semaines. On consignera systématiquement l'origine du matériel végétal et l'espèce utilisée pour l'essai.
17. La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai influenceront significativement sur le résultat de ce dernier, aussi les spécimens doivent-ils être choisis avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). L'appendice 4 fournit des précisions sur la préparation de l'organisme d'essai.

Culture

18. Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple lorsqu'aucun essai n'est prévu sur *Myriophyllum* durant un certain temps), les cultures peuvent être gardées sous un éclairage et à une température réduits ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). L'appendice 3 fournit des précisions sur la culture.
19. À partir de 21 jours et au moins 14 jours avant l'essai, un nombre suffisant d'organismes d'essai est transféré aseptiquement dans un milieu stérile fraîchement préparé, et mis en préculture pendant 14 à 21 jours dans les conditions de l'essai. L'appendice 4 fournit des précisions sur la préparation de la préculture.

Milieu expérimental

20. Il est recommandé d'utiliser un seul milieu nutritif pour *Myriophyllum spicatum* dans le cadre d'un système expérimental sans sédiment, tel que décrit à l'appendice 2. Il est conseillé de modifier le milieu d'Andrews pour la culture de *Myriophyllum spicatum* et pour les essais sur cette espèce, conformément aux indications de la référence (1). Le milieu d'Andrews modifié est préparé à partir de cinq solutions mères nutritives préparées séparément et auxquelles on ajoute du sucrose à hauteur de 3 %. L'appendice 2 fournit des précisions sur la préparation du milieu.
21. Les solutions d'essai sont obtenues à partir du milieu d'Andrews modifié concentré dix fois puis dilué selon ce qui convient. La composition de ce milieu est indiquée à l'appendice 2.

Solutions d'essai

22. Les solutions d'essai sont généralement préparées par dilution d'une solution mère. Les solutions mères de la substance d'essai sont habituellement obtenues par dissolution du produit chimique dans de l'eau déminéralisée (distillée ou désionisée). L'apport de nutriments est assuré par l'utilisation de milieu d'Andrews modifié concentré dix fois.

23. Les solutions mères du produit chimique d'essai peuvent être stérilisées par autoclavage à 121 °C durant 20 minutes ou par filtration stérile, à condition que la technique de stérilisation employée ne dénature pas le produit chimique. Il est également possible de préparer les solutions d'essai avec de l'eau déminéralisée ou un milieu stérile, dans des conditions stériles. On tiendra compte de la thermostabilité et de l'adsorption sur différentes surfaces pour choisir la méthode de stérilisation des solutions mères du produit chimique d'essai. C'est la raison pour laquelle il est conseillé de préparer les solutions mères en conditions stériles, c'est-à-dire en utilisant du matériel stérile pour dissoudre le produit chimique d'essai en conditions stériles (par exemple stérilisation à la flamme, hottes à flux laminaire, etc.) dans de l'eau stérile. Cette technique de préparation de solutions mères stériles peut être mise en œuvre tant pour les substances que pour les mélanges.
24. Normalement, la concentration maximale du produit chimique d'essai ne peut dépasser son hydrosolubilité dans les conditions expérimentales. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles dans l'eau, il est parfois nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion du produit chimique à l'aide d'un solvant organique ou d'un dispersant afin de faciliter l'ajout de quantités précises du produit chimique d'essai dans le milieu ainsi que sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/l; elle doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (5) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

Groupes traités et groupes témoins

25. Un essai de détermination de l'ordre de grandeur donnera une première idée de la toxicité du produit chimique d'essai sur *Myriophyllum spicatum* et permettra de sélectionner les concentrations expérimentales adéquates. L'essai définitif doit normalement porter sur cinq (comme dans l'essai d'inhibition de la croissance de *Lemna*, au chapitre C.26 de la présente annexe) à sept concentrations d'essai formant une série géométrique. Ces concentrations sont choisies de manière que les valeurs de la CSEO et de la CE₅₀ soient comprises dans la plage des concentrations d'essai (voir ci-dessous). Il est préférable que les concentrations d'essai ne soient pas espacées d'un facteur supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente faible. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il convient d'inclure au minimum cinq réplicats par concentration d'essai.
26. Le choix de la plage des concentrations expérimentales (pour la détermination de l'ordre de grandeur et/ou l'essai de toxicité définitif) doit tenir compte des aspects suivants:

Pour déterminer la CE_x, les concentrations expérimentales doivent encadrer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE₅₀, la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE₅₀. Si la CE₅₀ se situe en dehors de la plage des concentrations d'essai, les intervalles de confiance seront importants et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle.

S'il s'agit d'estimer la CMEO et la CSEO, la plus petite concentration d'essai doit être suffisamment faible pour que la croissance des myriophylles traités ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration d'essai la plus élevée doit être suffisamment importante pour que la croissance du groupe exposé soit significativement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété pour une plage de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée atteigne la limite de solubilité ou la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).

27. Chaque essai doit inclure des témoins sans produit chimique d'essai mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, de l'organisme d'essai (le matériel végétal choisi sera aussi homogène que possible et constitué de branches latérales fraîches obtenues dans les précultures, ramenées à 2,5 cm à partir de la base), des conditions environnementales et des procédures. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant le produit chimique d'essai. Le nombre de réplicats des récipients témoins (et des récipients contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal à dix.

28. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, le dispositif expérimental peut être modifié en augmentant le nombre de concentrations et en réduisant le nombre de réplicats par concentration. Cependant, le nombre de réplicats des témoins doit toujours s'élever à dix minimum.

Exposition

29. Les branches latérales fraîches obtenues en préculture et raccourcies à 2,5 cm en partant de la base sont réparties de façon aléatoire entre les récipients d'essai en conditions aseptiques; chaque récipient expérimental doit contenir une branche latérale de 2,5 cm dont une extrémité présente un méristème apical. Le matériel végétal choisi doit être de qualité identique dans tous les récipients expérimentaux.
30. L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire (ou un repositionnement plus fréquent des récipients).
31. Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration du produit chimique d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée est inférieure à 80 % de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (14 jours), une méthode semi-statique est recommandée. Dans ce cas, les plantes doivent être exposées à des solutions témoins et des solutions d'essai fraîchement préparées au moins une fois au cours de l'essai (par exemple le jour 7). La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité du produit chimique d'essai; une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de produits chimiques très instables ou volatiles.
32. La présente méthode d'essai n'aborde pas le scénario d'exposition fondé sur une application foliaire (pulvérisation).

Conditions de l'essai

33. On applique un éclairage fluorescent blanc chaud et/ou froid pour obtenir une intensité lumineuse comprise entre 100 et 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en termes de rayonnement photosynthétiquement actif (400-700 nm) mesuré à des points équidistants de la source de lumière, par exemple le fond des récipients d'essai (soit l'équivalent de 6 000 à 9 000 lux environ), avec un cycle alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, jouera sur la valeur mesurée. Les capteurs sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.
34. La température des récipients d'essai est maintenue à 23 ± 2 °C. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment pour tester des produits chimiques instables ou des métaux; le pH devra rester dans une fourchette de 6 à 9. On trouvera des indications supplémentaires dans le document (5).

Durée

35. L'essai prend fin 14 jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

Mesures et déterminations analytiques

36. Au début de l'essai, la longueur de la tige principale de l'organisme d'essai est de 2,5 cm (voir paragraphe 29); on la mesure à l'aide d'une règle (voir l'appendice 4) ou par photographie et analyse d'image. La longueur de la tige principale de l'organisme d'essai, qu'il semble normal ou non, doit être déterminée au début de l'essai, au moins une fois pendant la période d'exposition de 14 jours, puis à la fin de l'essai. Note: Pour les laboratoires qui ne peuvent pas faire d'analyse d'image, il est également possible d'utiliser une règle stérile pour mesurer la longueur de la tige principale en début d'essai et pendant l'exposition, à condition que la paillasse ait été stérilisée avant de placer les végétaux dans les récipients expérimentaux. Il convient de noter les changements observés dans le développement des plantes, notamment en ce qui concerne la déformation des tiges, l'apparence, les signes de nécrose, de chlorose, de rupture ou de perte de flottabilité, ainsi que l'aspect et la longueur des racines. On consignera également les caractéristiques notables du milieu expérimental, par exemple la présence d'éléments non dissous ou le développement d'algues, de champignons ou de bactéries dans le récipient d'essai.

37. Outre la détermination de la longueur de la tige principale au cours de l'essai, il convient d'évaluer les effets du produit chimique d'essai sur au moins trois des variables de mesure suivantes:
- Longueur totale des branches latérales
 - Longueur totale des tiges
 - Longueur totale des racines
 - Poids frais
 - Poids sec
 - Nombre de verticilles
- Note 1:* Les observations réalisées pendant l'essai de détermination de l'ordre de grandeur peuvent aider à choisir des variables supplémentaires pertinentes parmi les six énumérées ci-dessus.
- Note 2:* Il est hautement souhaitable de déterminer les poids frais et sec (paramètres iv et v).
- Note 3:* Étant donné que le sucrose et la lumière (exposition des racines à la lumière durant l'essai) sont susceptibles d'influencer les vecteurs de l'auxine (hormone de croissance végétale), et que certains produits chimiques ont des modes d'action similaires à ceux de l'auxine, l'intérêt de mesurer les effets sur les racines (paramètre iii) est discutable.
- Note 4:* Les résultats de l'essai circulaire montrent que pour la longueur totale des branches latérales (paramètre i), les coefficients de variation sont élevés (> 60 %). Quoi qu'il en soit, la longueur totale des branches latérales est comprise dans la longueur totale des tiges (paramètre ii), variable pour laquelle les coefficients de variation sont plus acceptables car ils restent inférieurs à 30 %.
- Note 5:* Il découle des considérations qui précèdent que les principales variables conseillées sont la longueur totale des tiges, le poids frais et le poids sec (paramètres ii, iv et v); le suivi du nombre de verticilles (paramètre vi) est laissé à la discrétion de l'opérateur.
38. La longueur de la tige principale et le nombre de verticilles présentent l'avantage de pouvoir être déterminés pour chaque récipient traité ou témoin au début, au cours et à la fin de l'essai par photographie et analyse d'image, bien qu'une règle (stérile) puisse aussi convenir.
39. La longueur totale des branches latérales, la longueur totale des racines (qui correspondent respectivement à la somme des longueurs de toutes les branches latérales et de toutes les racines) et la longueur totale des tiges (qui correspond à la somme de la longueur de la tige principale et de la longueur totale des branches latérales) peuvent être mesurées avec une règle à l'issue de l'exposition.
40. On détermine les poids frais et/ou sec au début de l'essai à l'aide d'un échantillon des précultures représentatif des végétaux utilisés pour lancer l'essai; à la fin de l'essai, ces poids sont déterminés à partir du matériel végétal contenu dans chaque récipient traité ou témoin.
41. La longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles peuvent être déterminés de la manière suivante:
- Longueur totale des branches latérales: La longueur des branches latérales peut être déterminée en mesurant toutes les branches latérales avec une règle à la fin de l'exposition. La longueur totale des branches latérales correspond à la somme des longueurs de toutes les branches latérales de chaque récipient traité ou témoin.
 - Longueur totale des tiges: La longueur de la tige principale peut être déterminée par analyse d'image ou à l'aide d'une règle. La longueur totale des tiges correspond à la somme de la longueur totale des branches latérales et de la longueur de la tige principale de chaque récipient traité ou témoin à la fin de l'exposition.

- iii. Longueur totale des racines: La longueur des racines peut être déterminée en mesurant toutes les racines avec une règle à la fin de l'exposition. La longueur totale des racines correspond à la somme des longueurs de toutes les racines de chaque récipient traité ou témoin.
- iv. Poids frais: Le poids frais peut être déterminé en pesant les organismes d'essai à la fin de l'exposition. La totalité du matériel végétal contenu dans chaque récipient traité ou témoin est rincé à l'eau distillée puis séché en le tamponnant avec du papier cellulosé. Après cette étape de préparation, on obtient le poids frais par pesée. La biomasse de départ (poids frais) est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux.
- v. Poids sec: Après les préparations destinées à la détermination du poids frais, les organismes d'essai sont séchés à 60 °C jusqu'à poids constant. Cette masse correspond au poids sec. La biomasse de départ (poids sec) est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux.
- vi. Nombre de verticilles: On compte tous les verticilles sur la tige principale.

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

42. Avec un dispositif en conditions statiques, le pH de chaque récipient traité doit être mesuré au début et à la fin de l'essai. Si le dispositif est en conditions semi-statiques, le pH est mesuré dans chaque lot de «nouvelle» solution expérimentale avant chaque renouvellement ainsi que dans les solutions «utilisées» correspondantes.
43. Il convient de mesurer l'intensité lumineuse dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points équidistants de la source de lumière et des organismes d'essai. Ces mesures sont effectuées au moins une fois pendant l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce (ou mesurée en continu par un enregistreur de données).
44. Au cours de l'essai, les concentrations du/des produit(s) chimique(s) d'essai sont déterminées à des intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.
45. Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que les concentrations du/des produit(s) chimique(s) d'essai ne restent pas dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement. Néanmoins, pour les essais où la concentration du/des produit(s) chimique(s) d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations d'essai maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations du produit chimique d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un réplicat de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les réplicats).
46. S'il s'avère que la concentration d'essai a pu être maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à $\pm 20\%$, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration du produit chimique d'essai (5).

Essai limite

47. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que le produit chimique d'essai n'entraîne aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu expérimental, ou dans le cas d'une formulation à sa limite de dispersion, on peut conduire un essai limite afin de comparer les réponses d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de réplicats de traitement doit être doublé. La croissance des plantes dans le groupe témoin et le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Variables de réponse

48. L'objectif de cet essai est d'établir les effets d'un produit chimique d'essai sur le développement végétatif de *Myriophyllum spicatum*. La présente méthode d'essai décrit deux variables de réponse.
- a) Taux de croissance spécifique moyen: cette variable est calculée en fonction de l'évolution logarithmique de la longueur de la tige principale, ainsi que de l'évolution logarithmique d'autres paramètres de mesure, à savoir la longueur totale des tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles au cours du temps (variables exprimées par jour), dans les témoins et dans chaque groupe traité. *Note*: Pour le paramètre de mesure longueur totale des branches latérales et longueur totale des racines, il n'est pas possible de calculer le taux de croissance spécifique moyen. Au début de l'essai, la plante n'a ni branches latérales, ni racines (conformément à la méthode de préparation à partir des précultures), or le taux de croissance spécifique moyen ne peut être calculé avec une valeur initiale nulle.
- b) Rendement: cette variable est calculée en fonction de l'évolution de la longueur de la tige principale, ainsi que d'autres paramètres de mesure — à savoir, de préférence, la longueur totale des tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles, ainsi que d'autres paramètres, si cela paraît utile — dans les témoins et dans chaque groupe traité jusqu'à la fin de l'essai.
49. Les estimations de la toxicité doivent reposer sur la longueur de la tige principale et sur trois variables de mesure supplémentaires (de préférence longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, voir paragraphe 37 et les notes 2, 4 et 5 qui y figurent), car certains produits chimiques sont susceptibles d'affecter plus fortement les autres variables de mesure que la longueur de la tige principale. Cet effet n'est pas visible si l'on ne calcule que la longueur de la tige principale.

Taux de croissance spécifique moyen

50. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée correspond à l'accroissement logarithmique des variables de croissance, à savoir la longueur de la tige principale et trois autres variables de mesure (longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles), grâce à la formule ci-dessous, appliquée à chaque réplicat des groupes témoins et traités:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

où:

μ_{i-j} : taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

N_i : variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps i

N_j : variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps j

t: période de temps comprise entre i et j

Pour chaque groupe traité ou témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

51. On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance. Évaluer également le taux de croissance section par section, afin d'apprécier les effets du produit chimique d'essai durant la période d'exposition (par exemple en analysant les courbes de croissance log-transformées).

52. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_r) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

où:

% Ir: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen

μ_C : valeur moyenne de μ dans le groupe témoin (*control*)

μ_T : valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

53. Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de la variable de mesure correspondant à la longueur de la tige principale, à laquelle s'ajoutent trois autres variables (de préférence longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles) pour les plantes de chaque récipient expérimental au début et à la fin de l'essai. Pour le poids sec comme pour le poids frais, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux. Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement (% I_y) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

où:

% I_y : pourcentage de réduction du rendement

b_C : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe témoin (*control*)

b_T : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe traité

Temps de doublement

54. Pour déterminer le temps de doublement (T_d) de la longueur de la tige principale et ainsi vérifier que ce critère de validité est respecté (voir paragraphe 8), on applique la formule suivante avec les données obtenues dans les récipients témoins:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des paragraphes 50-52.

Courbes concentration-effet

55. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable de réponse (I_t ou I_p , calculé comme indiqué aux paragraphes 53-54) en fonction du logarithme de la concentration du produit chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

56. Les estimations de la CE_x doivent reposer à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et sur le rendement (C_xE_p), chacune de ces variables de réponse étant dérivée de la longueur de la tige principale, et, éventuellement, d'autres variables de mesure (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles). En effet, certains produits chimiques peuvent avoir des effets différents sur la longueur de la tige principale et sur d'autres variables de mesure. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé: C_xE_t (longueur de la tige principale); C_xE_p (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles); C_xE_r (longueur de la tige principale); et C_xE_r (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles).

57. Il convient de noter que les valeurs de la CE_x calculées à l'aide de ces deux variables de réponse ne sont pas comparables, et que cette différence est prise en compte lors de l'exploitation des résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen ($C_x E_t$) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement ($C_x E_r$) — si les conditions expérimentales de la présente méthode d'essai sont appliquées — en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables de réponse.

Méthodes statistiques

58. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé, à l'aide de modèles probit ou logit ou Weibull (7), par exemple, mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les inévitables irrégularités de valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (7). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont prévues pour analyser des réponses de type tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (8) (9) (10) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.
59. Pour chaque variable de réponse à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque réplicat et non sur les moyennes par groupe traité.
60. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (10), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.
61. Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de variance (ANOVA). La moyenne pour chaque concentration est alors comparée à la moyenne des témoins en faisant appel à une méthode appropriée de comparaison multiple ou à des tests de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (12) (13) (14) (15) (16). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse d'homogénéité de la variance de l'ANOVA tient. On peut effectuer cette vérification graphiquement ou à l'aide d'un test formel (15). Les tests de Levene ou de Bartlett conviennent à cet effet. L'infirmité de l'hypothèse d'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (10) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.
62. En raison des avancées scientifiques récentes, on préconise l'abandon de la notion de CSEO et son remplacement par des estimations ponctuelles de la CE_x . Pour cet essai sur Myriophylles, aucune valeur de x appropriée n'a été établie. Toutefois, un intervalle allant de 10 à 20 % semble convenir (selon la variable de réponse choisie), et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} , ainsi que les limites de confiance associées.

Rapport

63. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:

- caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai

- Nom scientifique et source.

Conditions de l'essai

- Mode opératoire suivi (statique ou semi-statique).
- Date du début de l'essai et durée de l'essai.
- Milieu expérimental.
- Description de la conception de l'essai (récipients d'essai et couvercles, volumes des solutions, longueur de la tige principale par récipient expérimental au début de l'essai).
- Concentrations d'essai (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre de réplicats par concentration.
- Méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris utilisation éventuelle d'un solvant ou d'un dispersant.
- Température durant l'essai.
- Source, intensité et homogénéité lumineuses.
- Valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins.
- Méthode d'analyse du produit chimique d'essai, avec données appropriées sur l'évaluation de la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses).
- Méthodes de détermination de la longueur de la tige principale et des autres variables de mesure, par exemple longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles.
- État de la culture (stérile ou non stérile) de chaque récipient traité ou témoin à chaque observation.
- Toute déviation par rapport à la présente méthode d'essai.

Résultats

- Données brutes: longueur de la tige principale et autres variables de mesure pour chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse.
- Moyennes et écarts-types pour chaque variable de mesure.
- Courbes de croissance pour chaque variable de mesure.
- Calcul des variables de réponse pour chaque réplicat traité, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des réplicats.
- Représentation graphique de la relation concentration-effet.
- Estimation des effets toxiques pour les variables de réponse, par exemple CE_{50} , CE_{10} , CE_{20} et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CME0 et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer.
- Si l'on a effectué une analyse de variance, amplitude de l'effet détectable (par exemple, différence la moins significative).
- Toute stimulation de la croissance constatée, le cas échéant, dans un groupe traité.
- Tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai.
- Discussion des résultats, notamment concernant une influence éventuelle sur les résultats de l'essai de modifications apportées à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
 - (2) Maletzki, D. et al. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
 - (3) Chapitre C.26 de la présente annexe: *Lemna sp. Essai d'inhibition de la croissance*.
 - (4) OCDE (2014), "Myriophyllum spicatum Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 205, OCDE, Paris.
 - (5) OCDE (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.
 - (6) Chapitre C.51 de la présente annexe: Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment
 - (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
 - (8) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
 - (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
 - (10) OCDE (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.
 - (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
 - (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
 - (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
 - (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
 - (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Biomasse: poids frais et/ou sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse comprend la tige principale, toutes les branches latérales et toutes les racines.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Chlorose: décoloration de l'organisme d'essai, en particulier des verticilles, passant du vert au jaune.

CE_x: concentration du produit chimique d'essai dissous dans le milieu expérimental qui entraîne une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Myriophyllum spicatum* pendant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_c s'agissant du taux de croissance, et CE_r s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable de mesure utilisée, par exemple CE_r (longueur de la tige principale).

Croissance: augmentation de la variable de mesure, par exemple longueur de la tige principale, longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, pendant la période d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la variable de mesure pendant la période d'exposition. *Note:* Les variables de réponse relatives au taux de croissance ne dépendent pas de la durée de l'essai tant que la croissance des organismes témoins non traités obéit à une loi exponentielle.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Variables de mesure: les variables de tout type qui sont mesurées pour exprimer le critère d'évaluation de l'effet au moyen d'une ou plusieurs variables de réponse. Dans la présente méthode d'essai, les variables de mesure sont la longueur de la tige principale, la longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu mort (d'aspect blanc ou brun foncé) de l'organisme d'essai.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable de réponse: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans la présente méthode d'essai, le taux de croissance et le rendement représentent les variables de réponse dérivées des variables de mesure telles que la longueur de la tige principale, la longueur totale de tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai pendant lequel la solution d'essai n'est pas renouvelée.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Critère d'évaluation de l'effet: décrit le facteur général qui sera modifié, par rapport au témoin, par le produit chimique d'essai. Dans la présente méthode d'essai, le critère d'évaluation de l'effet est l'inhibition de la croissance, qui peut être exprimé par différentes variables de réponse dérivées d'une ou plusieurs variables de mesure.

Milieu d'essai: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées au produit chimique d'essai. Normalement, le produit chimique d'essai est dissous dans le milieu expérimental.

UVCB: substance de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques

Rendement: valeur de la variable de mesure choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition. *Note:* Lorsque la croissance des organismes non exposés obéit à une loi exponentielle, les variables de réponse fondées sur le rendement diminuent quand la durée du test augmente.

Appendice 2

MILIEU D'ANDREWS MODIFIÉ POUR LES PRÉCULTURES ET LES CULTURES MÈRES

Le milieu d'Andrews modifié nécessaire aux précultures et aux cultures mères est préparé à partir de cinq solutions mères nutritives élaborées séparément, auxquelles on ajoute 3 % de sucre.

Tableau 1

Composition de la solution nutritive d'Andrews (Norme ASTM E 1913-04)

| Production des solutions mères nutritives | | | Production de la solution nutritive |
|---|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| Solution mère | Produit chimique | Poids initial pour 1 000 ml | ml pour 5 l de solution nutritive |
| 1 | KCl | 74,6 mg | 50 |
| | KNO ₃ | 8,08 g | |
| | Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O | 18,88 g | |
| 2 | MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 9,86 g | 50 |
| 3 | Voir solution mère n° 3.1 ci-dessous | | 50 |
| 4 | KH ₂ PO ₄ | 2,72 g | 50 |
| 5 | FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,278 g | 50 |
| | Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O | 0,372 g | |

Les solutions mères peuvent être conservées au réfrigérateur pendant six mois (entre 5 et 10 °C). Seule la solution mère n° 5 a une durée de conservation inférieure (deux mois).

Tableau 2

Production de la solution mère n° 3.1 servant à préparer la solution mère n° 3

| Produit chimique | Poids initial en g/100 ml |
|--|---------------------------|
| MnSO ₄ * 4 H ₂ O | 0,223 |
| ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,115 |
| H ₃ BO ₃ | 0,155 |
| CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 0,0125 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O | 0,0037 |

Après obtention de la solution mère n° 3.1 (Tableau 2), la répartir en aliquotes d'environ 11 ml qui seront congelées à une température inférieure ou égale à - 18 °C. Ces portions congelées se conservent cinq ans.

Pour préparer la solution mère n° 3, décongeler une solution mère n° 3.1, en verser 10 ml dans une fiole volumétrique de 1 l et ajouter de l'eau ultra pure jusqu'à la jauge.

Pour obtenir le milieu d'Andrews modifié, verser environ 2 500 ml d'eau ultra pure dans une fiole volumétrique de 5 l. Y ajouter 50 ml de chaque solution mère, remplir 90 % de la fiole volumétrique avec de l'eau ultra pure et amener le pH à 5,8.

Ajouter ensuite 150 g de sucrose dissous (équivalent à 3 % dans 5 l), puis compléter jusqu'à la jauge avec de l'eau ultra pure. Enfin, verser la solution nutritive dans des fioles Schott de 1 l et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

La solution nutritive ainsi obtenue peut être conservée stérile au réfrigérateur (entre 5 et 10 °C) pendant trois mois.

Milieu d'Andrews modifié pour l'essai de toxicité dans un système sans sédiment

Le milieu d'Andrews modifié concentré dix fois qui entre dans la composition des solutions d'essai est préparé à partir des cinq solutions mères nutritives déjà mentionnées dans les tableaux 1 et 2, après ajout de sucrose à hauteur de 30 %. Pour ce faire, verser environ 100 ml d'eau ultra pure dans une fiole volumétrique de 1 l. Ajouter 100 ml de chacune des solutions mères puis amener le pH à 5,8. Ensuite, dissoudre du sucrose pour une concentration de 30 % (soit 300 g dans 1 000 ml), puis compléter avec de l'eau ultra pure jusqu'à la jauge.

Enfin, verser la solution nutritive dans des fioles Schott de 0,5 l et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

La solution nutritive concentrée dix fois ainsi obtenue peut être conservée stérile au réfrigérateur (entre 5 et 10 °C) pendant trois mois.

Appendice 3

ENTRETIEN D'UNE CULTURE MÈRE

Le présent appendice 3 décrit la culture mère de *Myriophyllum spicatum* L ⁽¹⁾, espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des myriophylles. Entre juin et août, elle produit de discrètes fleurs roses et blanches qui pointent à la surface de l'eau. Les plantes sont enracinées dans le sol grâce à un système de rhizomes robustes. Elles poussent dans tout l'hémisphère nord dans des eaux stagnantes eutrophiques mais non polluées et plutôt calcifères qui contiennent un substrat boueux. *Myriophyllum spicatum* s'épanouit mieux en eau douce, mais se trouve aussi en eau saumâtre.

La culture mère dans un système sans sédiment en conditions de laboratoire fait appel à des plantes stériles. On peut obtenir des plantes stériles auprès du laboratoire d'écotoxicologie de l'Umweltbundesamt allemand (Agence fédérale allemande pour l'environnement).

Il est aussi possible d'obtenir des organismes d'essai à partir de végétaux non stériles, conformément à la norme ASTM E 1913-04. La méthode de culture de spécimens de *Myriophyllum sibiricum* prélevés dans la nature indiquée ci-dessous est tirée du guide ASTM:

“Si l'on opte pour des plantes non stériles prélevées dans la nature, récolter des turions de *M. sibiricum* à l'automne. Placer ces turions dans un aquarium de 20 l contenant 5 cm de sédiment stérile recouvert de sable siliceux ou, par exemple, de Turface® et de 18 l d'eau de qualité réactif. Aérer l'aquarium, maintenir sa température à 15 °C ainsi que l'intensité lumineuse entre 200 et 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant 16 heures par jour. La culture des plantes en aquarium peut fournir des végétaux de remplacement si les cultures stériles sont détruites par un dysfonctionnement mécanique dans l'enceinte de croissance, par une contamination ou d'autres causes encore. Les spécimens cultivés dans l'aquarium ne sont pas stériles, et les cultures stériles ne peuvent être conservées dans un système de culture en discontinu. Pour stériliser la culture, les plantes sont retirées de l'aquarium et rincées pendant une demi-heure environ dans un courant d'eau désionisée. Elles sont ensuite désinfectées en conditions aseptiques dans une hotte à flux laminaire pendant moins de 20 min (jusqu'à ce que la majorité des tissus végétaux aient blanchi et que seul l'apex en croissance reste vert) dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (m/v) contenant 0,01 % d'un tensioactif adapté. Agiter le désinfectant et le matériel végétal. Les segments comptant plusieurs nœuds sont transférés dans des tubes de culture stériles contenant 45 ml de milieu d'Andrews modifié stérilisé, ensuite clos avec leurs bouchons ordinaires. On ne place qu'un segment végétal par enceinte expérimentale. Pour s'assurer que les récipients de culture sont bien fermés, on les scelle avec du film de laboratoire. Une fois qu'une culture stérile a été préparée, il convient de transférer les segments végétaux comptant plusieurs nœuds dans de nouvelles enceintes expérimentales contenant du milieu nutritif liquide nouvellement préparé tous les dix à douze jours. Des cultures sur boîtes de gélose ont montré que les plantes doivent être stériles et le demeurer pendant huit semaines avant le lancement de l'essai.”

Comme le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des champignons et des bactéries), l'ensemble du matériel, des solutions et des cultures seront manipulés en conditions stériles. Il convient de stériliser tous les liquides et le matériel expérimental avant de les utiliser. Cette stérilisation est effectuée par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou en autoclave durant 20 minutes à 121 °C. D'autre part, tous les ballons, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

Les cultures mères peuvent être conservées plus longtemps sous un éclairage et à une température réduits (50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 20 \pm 2 °C) sans qu'il faille les préparer à nouveau. Le milieu de croissance des myriophylles doit être à la même que celui utilisé pour l'essai, mais d'autres milieux riches en éléments nutritifs peuvent être utilisés pour les cultures mères.

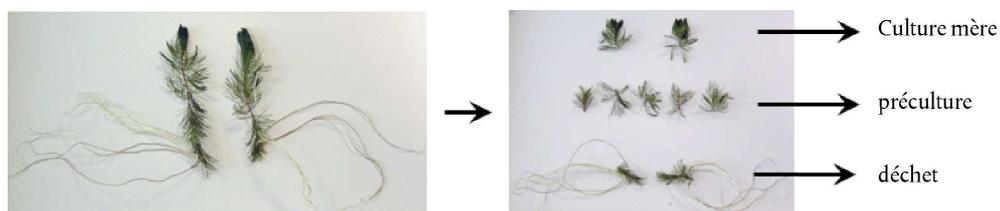
Les segments végétaux axéniques sont répartis dans plusieurs erlenmeyers de 500 ml et/ou dans des fioles Fernbach de 2 000 ml, chaque récipient contenant environ 450 ml (erlenmeyers) ou 1 000 ml (fioles Fernbach) de milieu d'Andrews modifié. Les récipients sont alors scellés avec des bouchons en cellulose pour garantir l'axénisation.

D'autre part, il est impératif de minutieusement passer à la flamme l'équipement de la paillasse stérile juste avant de l'utiliser. En fonction de leur nombre et de leur taille, les plantes sont transférées dans une nouvelle solution nutritive toutes les trois semaines environ.

Pour cette culture renouvelée, on peut utiliser les apex ou des segments de la partie médiane de la tige. Le nombre et la taille des plantes (ou segments de plante) transférées dépendent du nombre de plantes nécessaire. Par exemple, il est possible de transférer cinq segments de tige dans une fiole Fernbach et trois segments de tige dans un erlenmeyer, chaque segment ayant une longueur de 5 cm. Éliminer tout segment présentant des racines, des fleurs, des parties mortes ou qui se distinguent d'une manière ou d'une autre.

(1) Carl von Linné (né le 23 mai 1707 à Råshult/Älmhult, décédé le 10 janvier 1778 à Uppsala).

Figure 1

Sectionnement des plantes pour la culture mère et la préculture après 3 semaines de culture.

Les plantes sont cultivées dans des erlenmeyers de 500 ml et des fioles Fernbach de 2 000 ml dans un incubateur réfrigérant à 20 ± 2 °C avec un éclairage continu dont l'intensité est approximativement comprise entre 100 et $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ou 6 000-9 000 lux (émis par l'éclairage de l'enceinte avec une température de couleur correspondant à une «lumière blanche chaude»).

Figure 2

Culture des plantes dans un incubateur réfrigérant éclairé.

Il convient d'utiliser des récipients de culture en verre stériles et chimiquement propres (lavés à l'acide) et d'employer des techniques de manipulation aseptiques. En cas de contamination de la culture mère, notamment par des algues, des champignons et/ou des bactéries, il convient de préparer une nouvelle culture ou d'utiliser une culture mère provenant d'un autre laboratoire pour la remplacer.

Appendice 4

ENTRETIEN D'UNE PRÉCULTURE ET PRÉPARATION DE L'ORGANISME POUR L'ESSAI

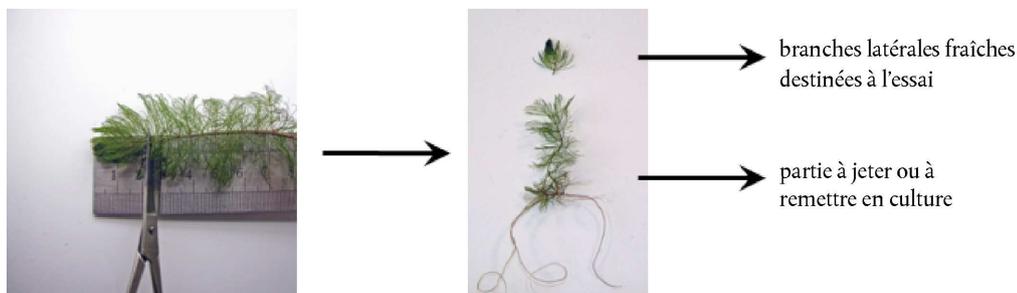
Pour obtenir une préculture, couper les tiges de la culture mère en segments comptant deux verticilles chacun. Placer ces segments dans des fioles Fernbach remplies de milieu d'Andrews modifié contenant 3 % de sucre. Chaque fiole peut recevoir jusqu'à 50 segments de tige. Cependant, on s'assurera que les segments sont vivants et ne présentent ni racines, ni branches latérales, ni bourgeons (voir graphique 1 de l'appendice 3).

La préculture dure 14 à 21 jours en conditions stériles dans une enceinte environnementale alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'intensité lumineuse sera comprise entre 100 et 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La température des récipients d'essai est maintenue à 23 ± 2 °C.

Étant donné que le milieu d'Andrews modifié contient du sucre (qui stimule la croissance des algues, des champignons et des bactéries), les solutions du produit chimique d'essai sont préparées et la culture est effectuée en conditions stériles. L'ensemble des liquides et du matériel expérimental est stérilisé avant utilisation. Cette stérilisation se fait par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou en autoclave durant 20 minutes à 121 °C. D'autre part, tous les ballons, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

On retire les tiges des fioles de préculture en conditions axéniques, en choisissant un matériel végétal aussi homogène que possible. Chaque essai nécessite au moins 60 spécimens (essai portant sur huit concentrations du produit chimique d'essai). Aux fins de l'essai, prélever des branches latérales des végétaux précultivés, les raccourcir à 2,5 cm à partir de leur base (mesure effectuée à l'aide d'une règle) et les transférer dans un béccher contenant du milieu d'Andrews modifié stérile. Ces branches latérales fraîches peuvent servir à l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment.

Figure 2

Sectionnement des plantes précultivées pour l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment.

C.51 Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 239 (2014) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Il existe des méthodes d'essai pour les essais portant sur des plantes aquatiques monocotylédones flottantes appartenant au genre *Lemna* (1) et pour des espèces d'algues (2). Ces méthodes sont utilisées en routine pour produire des données permettant d'évaluer les risques liés à des produits chimiques d'essai, en particulier des herbicides, pour des espèces végétales aquatiques non-cibles. Il est néanmoins parfois nécessaire d'obtenir des données pour d'autres espèces de macrophytes. Selon un document d'orientation récemment publié à l'issue d'un atelier de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) sur l'évaluation des risques liés aux pesticides pour les macrophytes aquatiques (*Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*, AMRAP), il est parfois nécessaire de disposer de données concernant les effets sur une espèce de macrophyte enracinée d'un produit chimique d'essai dont on sait que le mode d'action n'affecte pas les espèces *Lemna* et les algues, ou dont la répartition dans le sédiment laisse craindre une exposition par les racines (3). D'après les connaissances actuelles et l'expérience acquise à ce jour, ce sont les végétaux appartenant au genre des Myriophylles qui ont été choisis comme espèce privilégiée lorsque des données supplémentaires sur une espèce dicotylédone immergée et enracinée sont requises (4) (5) (6). Cet essai ne remplace pas les autres essais de toxicité aquatique, mais doit les compléter de manière à permettre une évaluation plus complète des dangers et des risques pour la flore aquatique. La méthode d'essai sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment complète l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment (7).
2. Le présent document décrit une méthode d'essai qui permet d'évaluer l'effet d'un produit chimique d'essai sur une plante aquatique enracinée, *Myriophyllum spicatum*, dans un système eau-sédiment. Cette méthode d'essai s'inspire partiellement des méthodes existantes (1) (2) (8) et tient compte de recherches récentes sur l'évaluation des risques pour les plantes aquatiques (3). La méthode avec un système eau-sédiment a été validée par un essai circulaire international mené sur des myriophylles cultivés en conditions statiques et exposés au produit chimique d'essai via la colonne d'eau (9). Ce système expérimental est toutefois facile à adapter pour exposer les plantes par le biais d'un sédiment chargé ou de la phase aqueuse dans des scénarios semi-statiques ou à dose pulsée, bien que ces modes opératoires n'aient pas été formellement étudiés dans l'essai circulaire. Par ailleurs, la méthode générale peut convenir pour d'autres espèces enracinées immergées ou émergées, notamment d'autres espèces de Myriophylles (dont *Myriophyllum aquaticum*) ou *Glyceria maxima* (10). Pour ces autres taxons, il faudra éventuellement modifier les conditions, la conception et la durée de l'essai. Plus spécifiquement, des travaux complémentaires sont nécessaires pour définir les procédures appropriées concernant *Myriophyllum aquaticum*. Ces options ne sont pas présentées en détail dans la présente méthode d'essai, qui décrit l'approche standard de l'exposition de *Myriophyllum spicatum* via la phase aqueuse dans un système statique.
3. La présente méthode d'essai s'applique aux substances, pour lesquelles elle a été validée [comme l'indique le rapport de l'essai circulaire (9)], soit aux préparations ou mélanges connus. Un essai sur myriophylles peut servir à répondre à un besoin de données de niveau 1 motivé par une éventuelle contamination du sédiment par une partie du produit chimique d'essai, ou par des questions relatives au mode d'action ou à la sélectivité. De même, un essai sur myriophylles en laboratoire peut être requis dans le cadre d'une stratégie de niveau supérieur répondant à des préoccupations quant aux risques pour les plantes aquatiques. C'est la motivation particulière de l'essai qui déterminera la voie d'exposition (via l'eau ou via le sédiment). Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données dans une perspective réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. L'essai est conçu pour évaluer les effets de produits chimiques sur le développement végétatif de plantes appartenant au genre des Myriophylles cultivées dans des milieux standardisés (eau, sédiment et nutriments). À cette fin, on plante des apex d'individus sains et sans fleurs dans un sédiment synthétique standard supplémenté avec des nutriments permettant leur croissance adéquate, puis on les maintient dans le milieu de Smart et Barko (appendice 1). Après une période d'implantation permettant aux racines de se former, les végétaux sont exposés à une série de concentrations d'essai ajoutées à la colonne d'eau. Il est aussi possible de simuler une exposition via le sédiment en chargeant le sédiment artificiel avec le produit chimique d'essai avant d'y transplanter les végétaux. Dans les deux cas, les plantes sont ensuite cultivées dans des conditions environnementales contrôlées pendant 14 jours. Les effets sur la croissance sont déduits d'évaluations quantitatives de la longueur de la tige, du poids frais et du poids sec, ainsi que d'observations qualitatives de symptômes tels que la chlorose, la nécrose ou les anomalies de croissance.

5. Pour quantifier les effets imputables au produit chimique, la croissance observée dans les solutions d'essai est comparée à celle des plantes témoins, et la concentration induisant un pourcentage donné d'inhibition de la croissance est déterminée et exprimée en termes de CE_x , où «x» peut correspondre à n'importe quelle valeur exigée par la réglementation, par exemple CE_{10} , CE_{20} et CE_{50} . Notons que les estimations de la CE_{10} et de la CE_{20} ne sont fiables et appropriées que dans les essais où les coefficients de variation établis pour les plantes témoins sont inférieurs au niveau d'effet recherché; pour la CE_{20} , cela signifie que ces coefficients de variation doivent rester sous la barre des 20 %.
6. On détermine le taux de croissance spécifique moyen (estimé à partir de la longueur de la tige, du poids frais et du poids sec de la tige) ainsi que le rendement (estimé à partir de l'accroissement de la tige, du poids frais et du poids sec de la tige) chez les plantes témoins et les plantes traitées. Le taux de croissance spécifique (t) et le rendement (r) sont ensuite utilisés pour déterminer la C_xE_t (par exemple $C_{10}E_t$, $C_{20}E_t$, $C_{50}E_t$) et la C_xE_r (par exemple, $C_{10}E_r$, $C_{20}E_r$, $C_{50}E_r$).
7. S'il y a lieu, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique en s'appuyant sur les estimations du rendement et des taux de croissance spécifiques moyens.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

8. Il conviendrait de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier le produit chimique d'essai dans le milieu expérimental.
9. Parmi les données sur le/les produit(s) chimique(s) d'essai qui pourraient servir à établir les conditions expérimentales figurent la formule structurale, la composition (dans le cas de substances multiconstituants, d'UVCB, de mélanges ou de préparations), la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, la constante d'acidité (pK_a), le coefficient de partage octanol-eau (K_{oc}), si possible le K_d dans les sédiments, la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de produit chimique d'essai risquent de se produire durant l'essai. Si l'on peut s'attendre à des pertes de produit chimique d'essai, celles-ci doivent être quantifiées et les mesures prises pour y remédier doivent être documentées. Si la solubilité et la stabilité du/des produit(s) chimique(s) d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu de croissance ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai. *Note:* Quand l'essai porte sur des herbicides qui ont une action peroxydante photo-induite, l'éclairage du laboratoire sera réglé de façon à émettre le même rayonnement ultraviolet que la lumière naturelle du soleil.
10. Le pH du milieu d'essai est mesuré et ajusté, s'il y a lieu. Il est particulièrement important de maîtriser le pH du milieu expérimental, notamment pour tester des métaux ou des produits chimiques sensibles à l'hydrolyse. Pour les essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, on trouvera des informations supplémentaires dans un document d'orientation de l'OCDE (11).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

11. Pour garantir la validité des résultats de l'essai, il faut que les moyennes de la longueur totale des tiges et du poids frais des tiges obtenues pour les plantes témoins aient au moins doublé au cours de la phase d'exposition de l'essai. Par ailleurs, les plantes témoins ne doivent pas présenter de symptômes apparents de chlorose, ni de signes manifestes de contamination par d'autres organismes comme des algues et/ou des films de bactéries, que ce soit sur le végétal, à la surface du sédiment ou dans le milieu expérimental.
12. Dans les cultures témoins, le coefficient de variation moyen du rendement basé sur la mesure du poids frais des tiges (entre le début et la fin de l'essai) ne doit pas dépasser 35 % entre les réplicats.

PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

13. Un ou plusieurs produits chimiques de référence, comme le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire (9), doivent faire l'objet d'essais réguliers pour vérifier la validité de la procédure d'essai au fil du temps. Dans l'essai circulaire, les valeurs moyennes de la CE_{50} du 3,5-DCP pour les différentes variables de réponse étaient comprises entre 4,7 et 6,1 mg/l (voir le rapport de l'essai circulaire pour plus de précisions sur les intervalles de confiance anticipés associés à ces valeurs). Il est conseillé de tester le produit chimique de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est rarement conduit, parallèlement aux essais de définitifs de toxicité. Le rapport statistique de l'essai circulaire international (9) comprend un guide indiquant les valeurs de la CE_{50} attendues pour le 3,5-DCP.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. L'essai est mené dans des conditions environnementales contrôlées, c'est-à-dire dans une enceinte de croissance, une salle de croissance ou un laboratoire où il est possible de maîtriser la longueur du jour, l'éclairage et la température (voir les paragraphes 56-58 de la section «Conditions expérimentales»). Les cultures mères doivent être conservées séparément des récipients d'essai.
15. Il convient de réaliser l'étude en utilisant des récipients expérimentaux en verre, par exemple des aquariums ou des béciers; on utilise communément des béciers en verre de 2 l (environ 24 cm de hauteur et 11 cm de diamètre). D'autres récipients (plus grands) pourraient néanmoins convenir, à condition que la hauteur d'eau permette une croissance illimitée et que les plantes restent immergées pendant toute la durée de l'essai.
16. Des pots de fleurs en plastique ou en verre (environ 9 cm de diamètre et 8 cm de hauteur, pour un volume de 500 ml) peuvent être utilisés pour planter les végétaux dans le sédiment. Des béciers en verre peuvent aussi remplir cet office, et sont même préférables dans certains cas, notamment pour tester des produits chimiques hydrophobes ou à K_{oc} élevé.
17. La taille des béciers ou des pots sera fonction des récipients d'essai et du dispositif expérimental choisis (voir ci-dessous). Pour le dispositif expérimental A (une tige par pot, trois pots par récipient), il faudra peut-être des pots plus petits ou des récipients plus grands. Pour le dispositif expérimental B (trois tiges par pot, un pot par récipient), la taille indiquée pour les pots et les récipients devrait convenir. Dans tous les cas, il faut que le sédiment soit recouvert d'au moins 12 cm d'eau, et on notera le rapport entre superficie/volume de sédiment et superficie/volume d'eau.

Organisme d'essai

18. Le principe général de cette méthode d'essai peut être appliqué à différentes espèces de plantes aquatiques. Cependant, les conditions définies dans la présente méthode d'essai ont été établies pour une espèce précise de Myriophylles, *Myriophyllum spicatum*. Cette espèce appartient à une famille de plantes dicotylédones, les Haloragidacées.
19. *Myriophyllum spicatum* (Myriophylle en épis) est une espèce immergée enracinée qui tolère des conditions très diverses et pousse dans des masses d'eau courantes ou stagnantes. C'est une plante vivace dont la partie non enracinée meurt pendant l'hiver. En général, ces végétaux fleurissent et produisent des graines librement, même si la propagation végétative à partir de bourgeons axillaires ou de fragments de tige, qui se détachent naturellement ou après une perturbation, est souvent la principale méthode de colonisation.

Culture de l'organisme d'essai

20. Le matériel végétal utilisé peut provenir de populations naturelles ou de fournisseurs de plantes aquatiques. Dans les deux cas, il convient de garder une trace de la source des plantes et d'en vérifier l'espèce. Lors des prélèvements de *Myriophyllum spicatum* dans la nature, il faut très minutieusement veiller à collecter l'espèce voulue, en particulier dans les régions où ce taxon peut former des hybrides avec d'autres Myriophylles. En cas de doute, il est conseillé de faire appel à des plantes cultivées en laboratoire dont l'espèce a été vérifiée et dont les sources sont connues. Il convient de ne pas utiliser les spécimens exposés à des contaminants chimiques ou prélevés sur des sites que l'on sait contaminés.
21. Dans les régions où *M. spicatum* n'est pas aisément disponible pendant les mois d'hiver, il peut s'avérer nécessaire d'entretenir durablement des cultures mères dans une serre ou en laboratoire. Les cultures mères sont entretenues dans des conditions similaires à celles de l'essai, mais l'énergie lumineuse et la température peuvent être réduites pour limiter la fréquence des opérations d'entretien (par exemple quand aucun essai sur myriophylles n'est prévu pendant un certain temps). Il est recommandé d'utiliser des pots de fleurs ou des aquariums plus grands que ceux qui sont employés dans les essais afin de laisser aux végétaux assez de place pour proliférer. La composition du sédiment et des milieux aqueux doit être identique à celle de l'essai, bien qu'il soit possible d'adopter d'autres méthodes de fertilisation du sédiment (en ayant par exemple recours à des préparations commerciales d'engrais à diffusion lente).

22. Les cultures mères ne doivent présenter aucune contamination visible par d'autres organismes comme des escargots, des algues filamenteuses, des champignons ou des insectes, notamment des œufs ou des larves du papillon *Paraponyx stratiotata* ainsi que des larves ou des adultes du curculionidé *Eubrychius velutus*. Pour éliminer les contaminations visibles, il faudra parfois rincer les végétaux à l'eau douce. En outre, on s'efforcera de réduire au minimum le développement d'algues unicellulaires et la contamination bactérienne, même s'il n'est pas nécessaire que les plantes soient parfaitement stériles. Les cultures mères sont surveillées et, s'il y a lieu, transplantées pour éviter la progression de contaminations par des algues ou des bactéries. Si ces contaminations deviennent problématiques, une aération des cultures mères peut s'avérer utile.
23. Dans tous les cas, les plantes sont cultivées ou acclimatées dans des conditions similaires — mais pas nécessairement identiques — aux conditions expérimentales pendant une période suffisante (supérieure à deux semaines) avant leur utilisation dans l'essai.
24. Les cultures mères qui fleurissent ne sont pas utilisées pour l'essai car les taux de croissance végétative sont généralement plus faibles pendant et après la floraison.

Sédiment

25. Il est recommandé d'utiliser pour cet essai un sédiment reconstitué préparé selon la méthode décrite au chapitre C.28 de la présente annexe (8). À part l'ajout d'éléments nutritifs, la méthode de préparation est la même que celle décrite dans la méthode d'essai C.28:
 - a) 4-5 % de tourbe (poids sec, pour $2 \pm 0,5$ % de carbone organique) avec un pH aussi proche que possible de 5,5-6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (taille des particules de préférence inférieure à 1 mm) et séchée uniquement à l'air.
 - b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %).
 - c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm).
 - d) ajouter un milieu nutritif aqueux de façon que le lot final de sédiment contienne 200 mg de chlorure d'ammonium et de phosphate de sodium par kilogramme de sédiment sec, avec un taux d'humidité compris entre 30 et 50 %.
 - e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) pour ajuster le pH du mélange final de le sédiment à $7,0 \pm 0,5$.
26. La source de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doit être connue et documentée. Si l'origine est inconnue ou suscite quelque préoccupation, il faut vérifier que chaque composant est exempt de contamination chimique (métaux lourds, composés organochlorés ou organophosphorés, etc.).
27. Il convient de mélanger les ingrédients secs du sédiment de manière homogène avant d'y incorporer uniformément la solution aqueuse de nutriments. Le sédiment humide est préparé au moins deux jours à l'avance pour que la tourbe soit complètement imbibée, et pour empêcher que des particules de tourbe hydrophobes ne surnagent une fois que le sédiment est recouvert par le milieu; avant utilisation, le sédiment humide peut être conservé dans l'obscurité.
28. Pour l'essai, le sédiment est transféré dans des récipients de taille adaptée, par exemple des pots de fleurs pouvant être contenus dans les récipients en verre (la superficie du sédiment doit recouvrir environ 70 % minimum de la superficie du récipient). Lorsque le récipient est troué au fond, on peut y placer un morceau de papier filtre pour empêcher le sédiment de s'échapper du récipient. Le sédiment est versé dans les pots de façon à obtenir une surface plane, puis on le recouvre d'une fine couche (2 à 3 mm environ) d'un matériau inerte tel que du sable, du gravier de jardin fin ou du corail broyé pour le maintenir en place.

Milieu d'essai

29. Il est conseillé d'employer le milieu de Smart et Barko (12) pour cultiver *Myriophyllum spicatum* et pour les essais. La préparation de ce milieu est décrite à l'appendice 1. Au début de l'essai, le pH du milieu (phase aqueuse) doit être compris entre 7,5 et 8,0 pour garantir une croissance végétale optimale.

Conception de l'essai

30. L'essai doit inclure au moins six récipients d'essai identiques (réplicats) du témoin non traité et au moins quatre réplicats pour chacune des concentrations d'exposition, lesquelles sont au nombre de cinq minimum.
31. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, le dispositif expérimental peut être modifié en augmentant le nombre de concentrations et en réduisant le nombre de réplicats par concentration.
32. Chaque récipient d'essai représente un réplicat contenant trois pousses. Il existe deux possibilités pour cultiver trois pousses par récipient d'essai:
 - Dispositif expérimental A: une pousse par pot et trois pots par récipient.
 - Dispositif expérimental B: trois pousses par pot et un pot par récipient.
 - D'autres dispositifs prévoyant une pousse par pot et par récipient d'essai sont acceptables, à condition d'ajuster le nombre de réplicats de manière à respecter les critères de validité.
33. Chaque récipient d'essai doit être assigné à un groupe traité de façon aléatoire. L'emplacement des récipients d'essai sur la surface réservée à l'essai doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température.

Concentrations du produit chimique d'essai et groupes témoins

34. Les concentrations forment habituellement une série géométrique, et ne sont pas séparées par un facteur supérieur à 3,2. Un essai de détermination de l'ordre de grandeur donnera une première idée de la toxicité du produit chimique d'essai et permettra de sélectionner les concentrations d'essai adéquates.
35. Pour déterminer une CE_x , il faut que les concentrations d'essai encadrent la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50} , la concentration d'essai la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50} . Si la CE_{50} se situe en dehors de la plage des concentrations, les intervalles de confiance seront importants et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle. Recourir à un plus grand nombre de concentrations d'essai améliorera l'intervalle de confiance encadrant la CE_x obtenue.
36. Pour déterminer la CMEO et la CSEO (critère facultatif d'évaluation de l'effet), il faut que la concentration d'essai la plus faible soit suffisamment faible pour que la croissance des plantes exposées ne soit pas sensiblement différente de celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance des plantes exposées soit significativement inférieure à celle des témoins. L'augmentation du nombre de réplicats accroît la puissance statistique du modèle analyse de variance/concentration sans effet.

Essai limite

37. Lorsqu'un essai de détermination de l'ordre de grandeur indique que le produit chimique d'essai n'entraîne aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou jusqu'à une concentration égale à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai ou, dans le cas d'une préparation, à sa limite de dispersion, on peut conduire un essai limite afin de comparer les effets observés sur un groupe témoin et sur un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité, ou à 1 000 mg/kg de sédiment sec). Cet essai doit suivre les principes généraux d'un essai dose-effet classique, à ceci près qu'il est conseillé d'augmenter le nombre minimal de réplicats à six récipients expérimentaux par témoin et par concentration. La croissance des plantes dans le groupe témoin et le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

Solutions d'essai

38. Les solutions d'essai sont habituellement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même obtenue par dissolution ou par dispersion du produit chimique d'essai dans le milieu de Smart et Barko avec de l'eau déminéralisée (distillée ou désionisée) (voir l'appendice 1).

39. Normalement, la concentration d'essai maximale ne peut dépasser l'hydrosolubilité du produit chimique d'essai ou, dans le cas des préparations, sa dispersibilité dans les conditions expérimentales.
40. Pour les produits chimiques peu solubles dans l'eau, il est parfois nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion du produit chimique à l'aide d'un solvant organique ou d'un dispersant afin de faciliter l'ajout de quantités précises du produit chimique d'essai dans le milieu ainsi que sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/l. Elle doit alors être identique dans tous les récipients traités et témoins (du solvant) et spécifiée dans le rapport. L'essai doit aussi inclure des réplicats de témoins non traités qui ne contiennent ni solvant, ni dispersant. On trouvera des indications supplémentaires sur le recours aux dispersants dans un document d'orientation de l'OCDE (11).

MODE OPÉRATOIRE

41. Le mode opératoire varie en fonction de la voie d'application du produit chimique d'essai (phase aqueuse ou sédimentaire). Le comportement probable du produit chimique d'essai dans un système eau-sédiment doit être pris en compte dans le choix du régime d'exposition utilisé dans l'essai (statique ou à renouvellement statique, eau chargée ou sédiment chargé). Les essais avec sédiment chargé sont parfois préférables, notamment quand on s'attend à ce qu'une partie non négligeable du produit chimique passe dans la phase sédimentaire.

Phase d'implantation

42. Couper des apex ou extrémités de pousses sains, c'est-à-dire sans pousses latérales, sur les plantes des cultures mères, pour obtenir des segments de 6 cm (\pm 1 cm). Pour le dispositif expérimental A (une pousse par pot et trois pots par récipient), placer une seule extrémité pousse tige par pot. Pour le dispositif expérimental B (trois pousses par pot et un pot par récipient), placer quatre à cinq apex par pot contenant du sédiment.
43. Dans les deux cas, inclure des plantes dans des pots supplémentaires pour pouvoir choisir une série de spécimens homogènes au début de l'essai, ainsi que pour disposer de plantes surnuméraires qui serviront à contrôler la croissance des racines immédiatement avant le traitement ou seront récoltées pour mesurer la biomasse et la longueur de la pousse au Jour 0.
44. Les pousses sont introduites dans le sédiment de façon à ce que trois centimètres environ de pousse, comportant deux nœuds, se trouve en dessous la surface.
45. Les pots sont ensuite transférés dans les récipients d'essai dans les mêmes conditions environnementales que pour la phase d'exposition, et sont maintenus sept jours dans le milieu de Smart et Barko afin de stimuler le développement racinaire.
46. Après cette étape, plusieurs plantes des pots surnuméraires sont retirées pour contrôler la croissance des racines. Si celle-ci n'est pas manifeste (pas d'extrémité de racine visible), il convient de prolonger la phase d'implantation jusqu'à ce qu'on constate un développement racinaire. Cette étape est recommandée pour garantir que les plantes sont en phase de croissance active au commencement de l'essai.

Choix d'une série de plantes homogènes

47. Pour le dispositif expérimental A (une pousse par pot et trois pots par récipient), les pots sont choisis en fonction de leur homogénéité avant le début de l'essai. Pour le dispositif expérimental B (trois pousses par pot, un pot par récipient), les plantes surnuméraires sont retirées pour ne laisser que trois spécimens de taille et d'apparence uniformes.

Exposition via la phase aqueuse

48. Les pots, choisis en fonction de leur homogénéité, sont placés dans des récipients d'essai conformément au dispositif adopté. On y ajoute ensuite le milieu de Smart et Barko. Ce faisant, il faut prendre soin de ne pas perturber le sédiment. À cet effet, on peut utiliser un entonnoir pour verser le milieu, ou placer un disque en plastique pour couvrir le sédiment pendant que le milieu est versé dans les récipients d'essai, à condition que le disque soit retiré immédiatement après. Il est aussi possible de placer les pots dans les récipients d'essai après l'ajout du milieu. Dans tous les cas, on pourra utiliser du milieu nouvellement préparé au début de la phase d'exposition, s'il y a lieu de minimiser le risque de développement d'algues ou de bactéries, ou pour préparer des lots individuels de solution d'essai destinée aux réplicats.
49. La longueur de pousse qui dépasse du sédiment est mesurée, soit avant soit après l'ajout du milieu.
50. Les quantités appropriées de produit chimique d'essai peuvent être ajoutées au milieu avant que celui-ci soit versé dans les récipients d'essai. On peut également incorporer le produit chimique d'essai dans le milieu après qu'il a été ajouté aux récipients d'essai. Dans ce cas, il conviendra de veiller à ce que le produit chimique d'essai soit uniformément réparti dans l'ensemble du système d'essai, sans perturber le sédiment.
51. Dans tous les cas, l'apparence du milieu d'essai (limpide, trouble, etc.) au début de l'essai doit être consignée.

Exposition via le sédiment

52. On prépare les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution du produit chimique d'essai à du sédiment nouvellement préparé. Une solution mère du produit chimique d'essai dissous dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un agitateur à rouleaux, d'un mélangeur pour aliments ou mélangée à la main. Si le produit chimique d'essai est peu soluble dans l'eau, il peut être dissous dans un volume aussi faible que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à environ 10 g de sable quartzique fin par récipient d'essai. On laisse le solvant s'évaporer, puis le sable est mélangé avec la quantité appropriée de sédiment pour un bécher. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier le produit chimique d'essai. Il faut garder à l'esprit que le volume et le poids du sable dopé avec le produit chimique d'essai doivent être pris en compte pour la préparation finale du sédiment (c'est-à-dire que le sédiment doit être préparé avec moins de sable). On s'assurera que le produit chimique d'essai ajouté au sédiment est totalement et uniformément réparti dans le sédiment.
53. Les pots sont remplis de sédiment dopé conformément à la méthode décrite précédemment. Les plantes présentant un système racinaire suffisant et choisies en fonction de leur homogénéité sont retirées des pots servant à la phase d'implantation et transplantées dans le sédiment chargé suivant la méthode exposée ci-dessus.
54. Les pots sont placés dans les récipients expérimentaux conformément au dispositif adopté. Le milieu de Smart et Barko est ensuite ajouté avec précaution (au moyen d'un entonnoir) pour éviter de perturber le sédiment. La longueur de pousse qui dépasse du sédiment est mesurée soit avant, soit après l'ajout du milieu.

Maintien des niveaux d'eau pendant la durée de l'essai

55. Le volume final d'eau est consigné et le niveau de l'eau est marqué sur chaque récipient d'essai. Si plus de 10 % de l'eau s'évapore pendant l'essai, il convient d'en ajuster la quantité avec de l'eau distillée. Le cas échéant, il est possible de recouvrir les béchers de façon non hermétique avec une protection transparente, par exemple un couvercle en plastique transparent, afin de minimiser l'évaporation et la contamination par des spores d'algues.

Conditions expérimentales

56. On applique un éclairage fluorescent blanc chaud et/ou froid pour obtenir une énergie lumineuse d'environ $140 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en termes de rayonnement photosynthétiquement actif (400-700 nm) mesuré à la surface de l'eau, avec un cycle alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'énergie lumineuse mesurée à la surface du milieu expérimental ne doit pas varier de plus de 15 % par rapport à la valeur choisie.

57. La température des récipients d'essai est maintenue à 20 ± 2 °C.
58. Le pH du milieu témoin ne doit pas augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité spécifiés précédemment peut être démontré.

Durée de l'essai

59. La période d'exposition est de 14 jours.

Mesures et déterminations analytiques

60. Après la phase d'implantation et immédiatement avant l'exposition (soit au Jour 0), les plantes surnuméraires de cinq pots sélectionnés au hasard (conception à trois tiges par pot) ou de 15 pots (conception à une tige par pot) sont prélevées afin d'évaluer la longueur de la pousse ainsi que les poids frais et sec, comme indiqué ci-dessous.
61. Pour les plantes qui passent en phase d'exposition, procéder aux évaluations suivantes, récapitulées dans le tableau 1:
- Déterminer et noter la longueur de la tige principale, le nombre de tiges latérales et la longueur des tiges latérales au moins à la fin de la période d'exposition (par exemple, Jour 14).
 - Déterminer visuellement et noter l'état de santé des végétaux au moins trois fois pendant la période d'exposition (par exemple, Jours 0, 7 et 14).
 - Déterminer et noter les poids frais et sec des pousses à la fin de l'essai (Jour 14).
62. La longueur de la tige est mesurée avec une règle. Si la plante présente des tiges latérales, leur nombre et leur longueur sont également établis.
63. Les évaluations visuelles de l'état de santé des plantes s'effectuent en consignait l'aspect des végétaux et l'état général du milieu expérimental. Voici quelques-unes des observations à noter:
- nécrose, chlorose ou autre décoloration, comme un rougissement excessif par rapport aux plantes témoins;
 - développement d'une contamination par des algues ou des bactéries;
 - anomalies de croissance, par exemple retard de croissance, altération de l'intervalle entre deux nœuds, malformation des tiges ou des feuilles, prolifération des tiges latérales, perte de feuilles, baisse de la pression de turgescence et fragmentation de la tige;
 - évaluations visuelles de l'état de santé des racines à la fin de l'essai, en éliminant délicatement le sédiment des racines par lavage afin d'observer le système racinaire. L'échelle proposée ci-dessous est recommandée pour évaluer les organismes traités par rapport au groupe témoin:
 - 1) absence de racines
 - 2) développement racinaire faible
 - 3) développement racinaire modéré
 - 4) très bon développement racinaire, semblable à celui des témoins.
64. Le poids frais est déterminé au début et à la fin de l'essai en sectionnant la pousse au ras du sédiment, puis en séchant la partie sectionnée en la tamponnant avant de la peser. On veillera à éliminer les particules de sédiment susceptibles d'adhérer à la base de la pousse. Les tiges sont alors placées dans une étuve à environ 60 °C et déshydratées jusqu'à l'obtention d'un poids constant, avant une nouvelle pesée qui permet de relever le poids sec.
65. Le tableau 1 récapitule les évaluations biologiques minimales à effectuer au cours de l'essai.

Tableau 1

Programme d'évaluation

| Jour post-exposition | <i>Myriophyllum spicatum</i> | | | |
|----------------------|---|---|--|-------------------|
| | Longueur de la tige, nombre et longueur des tiges latérales | Évaluation visuelle de l'état des pousses | Poids frais et poids sec de la pousse, Évaluation visuelle de l'état des racines | pH O ₂ |
| 0 | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 4 | — | — | — | — |
| 7 | — | Oui | — | Oui |
| 14 | Oui | Oui | Oui | Oui |

Oui: indique que les évaluations sont requises à cette date

—: indique que les évaluations ne sont pas nécessaires

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

66. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire maintenu dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce (ou mesurée en continu par un enregistreur de données).
67. Le pH et la concentration d'oxygène dissous du milieu sont vérifiés au début de l'essai, au moins une fois pendant l'essai et à la fin de l'essai dans tous les réplicats. Tous les jours où elles sont prévues, les évaluations sont effectuées à la même heure. Si, pour chaque concentration d'essai, on ne prépare qu'une solution globale pour remplir tous les réplicats, les déterminations au Jour 0 peuvent ne porter que sur ces solutions.
68. Il convient de mesurer l'énergie lumineuse dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce à des points situés au même niveau que la surface de la phase aqueuse. Ces mesures sont effectuées au moins une fois au début ou pendant l'essai. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, affectera la valeur mesurée. Les capteurs sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

Mesures analytiques du produit chimique d'essai

69. Pour que l'application du produit chimique d'essai soit jugée satisfaisante, il convient de l'étayer par des analyses des concentrations d'essai.
70. On prélève des échantillons d'eau afin de doser le produit chimique pour toutes les concentrations d'essai peu après le début de l'essai (c'est-à-dire le jour de l'application pour les produits chimiques d'essai stables, ou une heure après l'application pour les produits chimiques instables) et à la fin de l'essai.
71. Il est nécessaire d'établir les concentrations dans le sédiment et dans l'eau interstitielle du sédiment au début et à la fin de l'essai, au moins pour la concentration la plus élevée, sauf s'il est attesté que les produits chimiques d'essai sont stables dans l'eau (> 80 % de la concentration nominale). Il n'est pas forcément nécessaire d'effectuer les dosages dans le sédiment et l'eau interstitielle si la répartition du produit chimique d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, en termes de rapport sédiment/eau, de méthode d'application ou de type de sédiment).

72. Le prélèvement des échantillons de sédiment au début de l'essai étant susceptible de perturber le système d'essai, des récipients traités supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour faciliter les mesures analytiques au début et à la fin de l'essai. De même, quand des évaluations intermédiaires sont jugées nécessaires, c'est-à-dire au Jour 7, et quand les analyses exigent des échantillons de sédiment importants qui ne peuvent être retirés facilement du système d'essai, les déterminations analytiques doivent être pratiquées sur des récipients expérimentaux supplémentaires exposés au même traitement que ceux qui servent aux évaluations biologiques.
73. Il est conseillé de séparer l'eau interstitielle par centrifugation, par exemple à 10 000 g et 4 °C pendant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que le produit chimique d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Si la taille de l'échantillon est trop petite, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à établir.
74. Dans les essais semi-statiques (exposition via la phase aqueuse), où l'on prévoit que la concentration du produit chimique d'essai s'écartera de plus de 20 % de la concentration nominale pendant la durée de l'essai si les solutions expérimentales ne sont pas renouvelées, il convient de prélever des échantillons des solutions d'essai utilisées et fraîchement préparées afin d'y doser le produit chimique d'essai à chaque renouvellement.
75. Lorsque la concentration du produit chimique d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais que suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations d'essai maximale et minimale.
76. Dans tous les cas, il suffira de doser le produit chimique d'essai dans un seul réplicat pour chaque concentration expérimentale. Une autre option consiste à effectuer ces analyses en regroupant des échantillons de tous les réplicats pour chaque concentration.
77. S'il s'avère que la concentration du produit chimique d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats et les conclusions sur les effets étudiés qui en découlent peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement.
78. Les concentrations entraînant des effets sont alors établies à partir des concentrations nominales ou mesurées dans la phase aqueuse au début de l'essai.
79. Cependant, s'il est attesté que la concentration a baissé (variation de plus de 20 % par rapport à la concentration nominale ou mesurée initialement dans le récipient traité) au cours de l'essai, l'analyse des résultats doit se fonder sur la moyenne géométrique de la concentration pendant l'exposition, ou sur des modèles décrivant la diminution de la concentration du produit chimique d'essai dans le récipient traité (11).

ÉVALUATION DES DONNÉES

80. S'il est nécessaire d'employer un solvant ou un dispersant, on pourra regrouper les données des témoins solvant et non traités pour effectuer les analyses statistiques, à condition que les résultats obtenus dans ces groupes non exposés et contenant le solvant ne présentent pas de différence statistiquement significative.

Variables de réponse

81. Cet essai a pour objectif de déterminer les effets du produit chimique d'essai sur le développement végétatif de l'espèce d'essai au moyen de deux variables de réponse, à savoir le taux de croissance spécifique moyen et le rendement:

Taux de croissance spécifique moyen

82. Cette variable de réponse est fondée sur l'évolution logarithmique de la longueur totale des tiges, du poids frais total et du poids sec total des pousses au cours du temps dans les groupes témoins et dans chaque groupe traité. Cette variable est calculée pour chaque réplicat de chaque groupe témoin ou traité. La longueur moyenne et le poids moyen des trois plantes d'un récipient (réplicat) et, par suite, le taux de croissance de chaque réplicat, sont calculés en appliquant la formule suivante:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

où:

μ_{i-j} : taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

N_i : variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps i

N_j : variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps j

t: période de temps comprise entre i et j

83. À partir des résultats relevés dans les réplicats, on calcule une valeur moyenne du taux de croissance ainsi que des estimations de la variance pour chaque groupe témoin ou traité.
84. On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance.
85. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_i) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\%I_i = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

où:

$\% I_i$: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen

μ_c : valeur moyenne de μ dans le groupe témoin (*control*)

μ_T : valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

86. Cette variable de réponse est fondée sur l'évolution de la longueur totale des tiges, du poids frais total et du poids sec total des pousses au cours du temps dans les groupes témoins et dans chaque groupe traité. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_r = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

où:

$\% I_r$: pourcentage de réduction du rendement

b_c : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe témoin (*control*)

b_T : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe traité

Courbes concentration-effet

87. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable de réponse (I_t ou I_p , calculé comme indiqué précédemment) en fonction du logarithme de la concentration du produit chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

88. Les estimations de la CE_x (par exemple, CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et, le cas échéant, sur le rendement (C_xE_p), chacune de ces variables de réponse découlant de la longueur totale des tiges, du poids frais total et du poids sec total des pousses.
89. Il convient de noter que les valeurs de la CE_x calculées à l'aide de ces deux variables de réponse ne sont pas comparables, et que cette différence est prise en compte lors de l'exploitation des résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_p) — si les conditions expérimentales de la présente méthode d'essai sont appliquées — en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables de réponse.

Méthodes statistiques

90. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé, par exemple dans des unités probit ou logit ou Weibull (13), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les inévitables irrégularités de valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (13). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont prévues pour analyser des réponses de type tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (14) (15) (16) et (17) décrivent des procédures spécifiques permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.
91. Pour chaque variable de réponse à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Les limites de confiance à 95 % sont établies pour chaque estimation et la validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque réplicat et non sur les moyennes par groupe traité.
92. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (18), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.
93. Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de variance (ANOVA). La moyenne pour chaque concentration est alors comparée à la moyenne des témoins en faisant appel à une méthode appropriée, par exemple les tests de Dunnett ou de William (19) (20) (21) et (22). Il est nécessaire de vérifier si les hypothèses de distribution normale et d'homogénéité de la variance de l'ANOVA tiennent, à l'aide respectivement du test de Shapiro-Wilks et du test de Levene. L'infirmité des hypothèses de distribution normale et d'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance et/ou la déviation de la loi normale sont extrêmes et ne peuvent être corrigées par une transformation, on envisagera d'effectuer l'analyse en appliquant des méthodes comme le test t de Welch avec correction de Bonferroni, le test de tendance régressif de Jonkheere-Terpstra ou le test des médianes de Bonferroni. La référence (16) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

RAPPORT

94. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCBs et mélanges:

- caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai

- nom scientifique et source.

Conditions de l'essai

- durée et conditions de la phase d'implantation;
- procédé expérimental appliqué (statique ou semi-statique);
- date du début de l'essai et durée de l'essai;
- milieu expérimental, c'est-à-dire sédiment et milieu nutritif liquide;
- description de la conception expérimentale: enceinte/pièce de croissance ou laboratoire, récipients expérimentaux et couvercles, volumes des solutions, longueur et poids des plantes par récipient expérimental au début de l'essai, rapport entre la superficie du sédiment et celle de l'eau, rapport entre le volume du sédiment et celui de l'eau;
- concentrations d'essai (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre de réplicats par concentration;
- méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris utilisation éventuelle d'un solvant ou d'un dispersant;
- température durant l'essai;
- source de lumière, énergie lumineuse ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
- valeurs du pH dans les milieux des groupes témoins et traités, et aspect des milieux expérimentaux au début et à la fin de l'essai;
- concentrations d'oxygène;
- méthode d'analyse et données appropriées sur l'évaluation de la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses);
- méthodes de détermination des variables de mesure, par exemple longueur, poids sec, poids frais;
- tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

Résultats

- données brutes: longueur des tiges et poids des pousses par pot, et autres variables de mesure pour chaque récipient traité et témoin à chaque observation, et dates des analyses conformément au programme d'évaluation fourni dans le tableau 1;
- moyennes et écarts-types pour chaque variable de mesure;
- courbes de croissance pour chaque concentration;
- temps de doublement/taux de croissance chez les témoins d'après le poids frais et la longueur des tiges, y compris le coefficient de variation du rendement pour le poids frais;
- calcul des variables de réponse pour chaque réplicat traité, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des réplicats;
- représentation graphique de la relation concentration-effet;
- estimation des effets toxiques pour les variables de réponse, par exemple CE_{50} , et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CME0 et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer;

- si l'on a effectué une analyse de variance, puissance de l'effet détectable (par exemple, différence significative minimale);
- toute stimulation de la croissance constatée, le cas échéant, dans un groupe traité;
- tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai;
- discussion des résultats, notamment concernant une influence éventuelle de modifications apportées à la présente méthode d'essai sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Chapitre C.26 de la présente annexe: *Lemna sp.* essai d'inhibition de la croissance.
- (2) Chapitre C.3 de la présente annexe: *Algues d'eau douce et cyanobactéries*, essai d'inhibition de la croissance.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, *Environmental Pollution*, Vol. 153, pp. 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Qualité de l'eau — Détermination de l'effet toxique des sédiments sur la croissance de *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, *Pest Management Science*, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- (7) Chapitre C.50 de la présente annexe: Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment
- (8) Chapitre C.28 de la présente annexe: *Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment*
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system", Publications Santé et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 206, OCDE, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, *Pest Management Science*, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.
- (11) OCDE (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", Publications Santé et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, *Aquatic Botany*, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science Technology*, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OCDE (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", Publications Santé et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

-
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
-

Appendice 1

COMPOSITION DU MILIEU DE SMART ET BARKO

| Ingrédient | Quantité de réactif ajoutée à l'eau (*) (mg/l) |
|--|--|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 91,7 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 69,0 |
| NaHCO_3 | 58,4 |
| KHCO_3 | 15,4 |
| pH (équilibre avec l'atmosphère) | 7,9 |

(*) eau déminéralisée (distillée ou désionisée)

Appendice 2

DÉFINITIONS

Biomasse: poids frais et/ou sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse comprend la tige principale, toutes les branches latérales et toutes les racines.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Chlorose: décoloration de l'organisme d'essai, en particulier des verticilles, passant du vert au jaune.

CE_x: concentration du produit chimique d'essai dissous dans le milieu expérimental qui entraîne une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Myriophyllum spicatum* pendant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_c s'agissant du taux de croissance, et CE_r s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable de mesure utilisée, par exemple CE_r (longueur de la tige principale).

Croissance: augmentation de la variable de mesure, par exemple longueur de la tige principale, longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, pendant la période d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la variable de mesure pendant la période d'exposition. *Note:* Les variables de réponse relatives au taux de croissance ne dépendent pas de la durée de l'essai tant que la croissance des organismes témoins non traités obéit à une loi exponentielle.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Variables de mesure: les variables de tout type qui sont mesurées pour exprimer le critère d'évaluation de l'effet au moyen d'une ou plusieurs variables de réponse. Dans la présente méthode d'essai, les variables de mesure sont la longueur de la tige principale, la longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu mort (d'aspect blanc ou brun foncé) de l'organisme d'essai.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable de réponse: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans la présente méthode d'essai, le taux de croissance et le rendement représentent les variables de réponse dérivées des variables de mesure telles que la longueur de la tige principale, la longueur totale de tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai pendant lequel la solution d'essai n'est pas renouvelée.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Critère d'évaluation de l'effet: décrit le facteur général qui sera modifié, par rapport au témoin, par le produit chimique d'essai. Dans la présente méthode d'essai, le critère d'évaluation de l'effet est l'inhibition de la croissance, qui peut être exprimé par différentes variables de réponse dérivées d'une ou plusieurs variables de mesure.

Milieu expérimental: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées au produit chimique d'essai. Normalement, le produit chimique d'essai est dissous dans le milieu expérimental.

UVCB: substance de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques

Rendement: valeur de la variable de mesure choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition. *Note:* Lorsque la croissance des organismes non exposés obéit à une loi exponentielle, les variables de réponse fondées sur le rendement diminuent quand la durée du test augmente.
