

LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Transformation aérobie et anaérobie dans les sédiments aquatiques

INTRODUCTION

1. Les produits chimiques peuvent s'introduire dans les couches superficielles ou profondes des eaux de surface par diverses voies, comme l'application directe, les pertes lors de l'épandage, le ruissellement, le drainage, l'élimination de déchets, les effluents industriels, domestiques et agricoles et les dépôts d'origine atmosphérique. Cette Ligne directrice décrit une méthode d'essai ayant pour objet d'évaluer en laboratoire la transformation aérobie et anaérobie des substances organiques dans les sédiments aquatiques. Elle s'appuie sur des Lignes directrices existantes (1)(2)(3)(4)(5)(6). Les participants à l'atelier de l'OCDE sur la sélection de sols et de sédiments, tenu à Belgirate (Italie) en 1995 (7), ont établi notamment le nombre et les types de sédiments à utiliser dans cet essai. Ils ont aussi émis des recommandations concernant la collecte, le traitement et le stockage des échantillons de sédiments, d'après les lignes directrices de l'ISO (8). Ces études sont requises pour les produits chimiques appliqués directement sur l'eau ou qui risquent d'atteindre le milieu aquatique par les voies précitées.

2. Les conditions qui règnent dans les sédiments aquatiques naturels sont souvent aérobies dans la phase aqueuse supérieure. La couche superficielle des sédiments peut être aérobie ou anaérobie, tandis que les couches plus profondes sont ordinairement anaérobies. Aussi cet avant-projet décrit-il des essais aérobies et anaérobies qui couvrent toutes ces possibilités. L'essai en aérobiose est pratiqué au moyen d'un montage simulant une colonne d'eau aérobie surmontant une couche de sédiments qui, elle-même, évolue de l'aérobiose, en surface, vers l'anaérobiose selon un gradient. L'essai anaérobie reproduit un système eau-sédiment totalement anaérobie. Si les circonstances amènent l'expérimentateur à s'écarter sensiblement de ces recommandations, par exemple à utiliser des extraits de sédiment intacts ou des sédiments qui ont pu être exposés à la substance d'essai, il existe d'autres méthodes prévues à cette fin (9).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. La méthode décrite dans cette Ligne directrice fait intervenir des systèmes d'étude des sédiments aquatiques aérobie et anaérobie (voir à l'annexe 1) qui permettent de :

- (i) mesurer la vitesse de transformation de la substance d'essai dans le système eau-sédiment,
- (ii) mesurer la vitesse de transformation de la substance d'essai dans le sédiment,
- (iii) mesurer la vitesse de minéralisation de la substance d'essai et/ou de ses produits de transformation (si on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C),
- (iv) identifier et de quantifier les produits de transformation dans l'eau et dans les sédiments, notamment par un bilan massique (si on utilise une substance d'essai marquée) et
- (v) mesurer la répartition de la substance d'essai et de ses produits de transformation entre l'eau et les sédiments à l'issue d'une période d'incubation dans l'obscurité (pour éviter une prolifération d'algues, par exemple) à température constante.

On calculera les demi-vies, le TD₅₀, le TD₇₅ et le TD₉₀ lorsque les résultats le permettent, mais ces valeurs ne peuvent être extrapolées loin au-delà de la période expérimentale (Voir les définitions à l'annexe 2).

4. Les études aérobie et anaérobie demandent au moins deux sédiments accompagnés des eaux qui les baignent (7). Dans certains cas, cependant, il pourra s'avérer nécessaire de mettre plus de deux sédiments aquatiques à l'essai, par exemple pour un produit chimique susceptible d'être présent en eau douce et/ou dans les milieux marins.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

5. La méthode est généralement applicable aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles on dispose d'une méthode d'analyse suffisamment sensible et précise. Elle s'applique aux produits légèrement volatils, non volatils, solubles ou peu solubles dans l'eau. L'essai ne convient pas aux produits très volatils dans l'eau (p. ex. fumigants, solvants organiques) qui ne peuvent donc pas rester dans l'eau et/ou les sédiments dans les conditions expérimentales de cet essai.

6. La méthode a été employée jusqu'à présent pour étudier la transformation des substances chimiques dans les eaux douces et les sédiments, mais peut théoriquement s'appliquer aussi aux systèmes d'estuaires/marins. Il est déconseillé de simuler les conditions régnant dans les eaux courantes (par exemple les cours d'eau) ou la pleine mer.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. La vitesse de transformation peut se mesurer sur une substance d'essai non marquée ou radiomarquée, bien que cette dernière soit préférable. Il faut utiliser une substance marquée pour étudier la voie de transformation et établir un bilan massique. Le marquage au ¹⁴C est recommandé, mais d'autres isotopes, tels que ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P, peuvent aussi convenir. Le marqueur devra autant que possible se situer dans la ou les parties les plus stables de la molécule¹. La pureté chimique ou radiochimique de la substance d'essai doit atteindre au moins 95 pour cent.

8. Avant de procéder à l'essai, il faudra connaître les informations suivantes sur la substance d'essai :

- (a) solubilité dans l'eau [Ligne directrice 105 de l'OCDE] (10);
- (b) solubilité dans les solvants organiques ;
- (c) pression de vapeur [Ligne directrice 104 de l'OCDE] (10) et constante de la loi de Henry ;
- (d) coefficient de partage n-octanol/eau [Lignes directrices 107 et 117 de l'OCDE] (10);
- (e) coefficient d'adsorption (K_d , K_f ou K_{oc} , selon les besoins) [Ligne directrice 106 de l'OCDE] (10);
- (f) hydrolyse [Ligne directrice 111 de l'OCDE] (10);
- (g) constante de dissociation (pK_a) [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (10).
- (h) structure chimique de la substance d'essai et position des isotopes marqueurs, le cas échéant.

Note : La température à laquelle s'effectuent ces mesures doit être rapportée.

¹ Si, par exemple, la substance d'essai renferme un cycle, ce dernier doit être marqué ; si la substance d'essai contient deux ou plusieurs cycles, il faudra peut-être conduire des études supplémentaires afin d'évaluer le devenir de chaque cycle marqué et d'obtenir des informations pertinentes sur la formation des produits de transformation.

9. D'autres informations concernant notamment la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes, la biodégradabilité immédiate et/ou inhérente et la transformation aérobie et anaérobie dans le sol peuvent aussi être utiles.

10. Il faudrait qu'il existe des méthodes d'analyse (notamment des méthodes d'extraction et de purification) pour identifier et quantifier la substance d'essai et ses produits de transformation dans l'eau et les sédiments (voir aussi aux paragraphes 14 et 15).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

11. On aura besoin de substances de référence pour identifier et quantifier les produits de transformation par spectroscopie et chromatographie.

DÉFINITIONS ET UNITÉS

12. Voir à l'annexe 2.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Récupération

13. L'extraction et l'analyse d'au moins deux échantillons d'eau et de sédiments immédiatement après l'ajout de la substance d'essai donnent une première indication de la répétabilité de la méthode d'analyse et de l'uniformité de la procédure d'application pour la substance d'essai. Aux stades ultérieurs des essais, le taux de récupération se déduit des bilans massiques de chaque substance (si on travaille avec des substances marquées). Le pourcentage de récupération devrait être compris entre 90 pour cent et 110 pour cent pour les produits marqués (6) et entre 70 pour cent et 110 pour cent pour les produits non marqués.

Répétabilité et sensibilité de la méthode d'analyse

14. La répétabilité de la méthode d'analyse (à l'exclusion du rendement d'extraction initial) destinée à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être vérifiée par l'analyse répétée une fois du même extrait des échantillons d'eau ou de sédiments, incubés suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

15. La limite de détection de la méthode d'analyse appliquée à la substance d'essai et aux produits de transformation devrait atteindre au moins $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dans l'eau ou les sédiments ou 1 pour cent de la dose employée selon celle des deux valeurs qui est la plus faible. Il y a lieu de stipuler également la limite de quantification.

Précision des résultats de la transformation

16. L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps donne une indication valable de la précision de la courbe de transformation et permet de calculer les intervalles de confiance des demi-vies (dans le cas d'une pseudo-cinétique de premier ordre) ou du TD_{50} et, le cas échéant, du TD_{75} et du TD_{90} .

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Dispositif expérimental et instruments

17. Normalement, l'expérimentateur utilise des récipients en verre (p. ex. flacons, tubes à centrifuger), sauf si des informations préliminaires (comme le coefficient de partage n-octanol/eau, les données sur la sorption) indiquent que la substance d'essai risque d'adhérer au verre, auquel cas on envisagera d'employer un autre matériau (comme le téflon). Si l'adhésion de la substance au verre est avérée, ce problème pourrait être résolu par une ou plusieurs des méthodes décrites ci-dessous :

- déterminer la masse de la substance d'essai et des produits de transformation sorbés au verre ;
- nettoyer toute la verrerie au solvant à la fin de l'essai;
- recourir à des produits préparés (voir aussi au paragraphe 36);
- utiliser une quantité plus importante de co-solvant pour introduire la substance d'essai dans le milieu expérimental ; le co-solvant ne devrait pas solvoliser la substance d'essai.

18. Des dispositifs d'essai courants, le système dynamique gazeux et l'appareil biométrique, sont illustrés respectivement par des exemples aux annexes 3 et 4 (11). D'autres systèmes d'incubation appropriés sont décrits dans la référence 12. Le dispositif expérimental doit être conçu de telle sorte qu'il autorise les échanges d'air ou d'azote et le piégeage des produits volatils. Les dimensions du dispositif doivent être conformes au protocole de l'essai (voir au paragraphe 32). La ventilation peut être assurée par un léger barbotage ou par passage d'air ou d'azote à la surface de l'eau. Dans ce dernier cas, il est conseillé d'agiter doucement l'eau à partir haut pour mieux répartir l'oxygène ou l'azote dans l'eau. Il ne faut pas utiliser d'air dépourvu de CO₂ car cela risque d'augmenter le pH de l'eau. Dans un cas comme dans l'autre, on évitera autant que possible de remuer les sédiments. Les substances un peu volatiles doivent être testées dans un appareil biométrique, où l'eau est légèrement agitée en surface. On peut aussi utiliser des récipients fermés comportant un espace libre rempli d'air atmosphérique ou d'azote et munis d'ampoules internes destinées à piéger les produits volatils (13). Dans l'essai aérobique, on renouvelle régulièrement le gaz qui occupe l'espace libre pour compenser la consommation d'oxygène par la biomasse.

19. Parmi les pièges appropriés à la collecte des produits de transformation volatils, citons les solutions à 1 mole·dm⁻³ d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium pour le dioxyde de carbone² et l'éthylèneglycol, et l'éthanolamine ou une solution de paraffine à 2 pour cent dans du xylène pour les composés organiques. Les substances volatiles formées en anaérobiose, comme le méthane, peuvent être collectées, par exemple, à l'aide de tamis moléculaires. On peut, par exemple, brûler ces produits volatiles en poussant la combustion jusqu'au dégagement de CO₂ en faisant passer le gaz à travers un tube de quartz rempli de CuO porté à 900 °C et en piégeant le CO₂ formé dans un absorbeur comportant un produit alcalin (14).

20. L'analyse chimique de la substance d'essai et des produits de transformation fait appel à des techniques de laboratoire telles que la chromatographie gaz-liquide, la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), la chromatographie sur couche mince, la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire, etc. ainsi qu'à des systèmes de détection pour les substances radiomarquées ou non marquées, le cas échéant. Les substances

² Ces solutions absorbantes alcalines absorbant également le dioxyde de carbone de l'air de ventilation et celui formé par la respiration dans les essais aérobiques, il faudra les changer à intervalles réguliers afin d'éviter leur saturation et, par suite, la disparition de leur capacité d'absorption.

radiomarquées requièrent également un compteur à scintillation liquide et un oxydateur (pour la combustion des échantillons de sédiment avant l'analyse de la radioactivité).

21. On aura besoin également d'instruments de laboratoire courants pour conduire les déterminations physico-chimiques et biologiques (voir au tableau 1, paragraphe 26), de verrerie, de produits chimiques et de réactifs, selon les besoins.

Sélection et nombre de sédiments aquatiques

22. Les sites de prélèvement sont choisis en fonction de l'objectif de l'essai dans une situation donnée. En sélectionnant les sites de prélèvement, on tiendra compte de l'historique des éventuels apports agricoles, industriels ou domestiques au captage et aux eaux en amont. Il ne faut pas utiliser les sédiments si ceux-ci ont pu être contaminés par la substance d'essai ou un de ses analogues structuraux au cours des quatre dernières années.

Sélection des sédiments

23. Les études aérobies sont normalement menées sur deux sédiments différents (7). Les deux sédiments retenus doivent différer quant à la teneur en carbone organique et à la texture. On choisira un sédiment possédant une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 pour cent) et une texture fine, et un sédiment à faible teneur en carbone organique (0,5-2,5 pour cent) et à texture grossière. La différence entre les teneurs en carbone organique doit en principe être au moins de 2 pour cent. La "texture fine" correspond à une teneur [argile + limon]³ supérieure à 50 pour cent et la "texture grossière" à une teneur [argile + limon] inférieure à 50 pour cent. L'écart entre les teneurs en [argile + limon] des deux sédiments doit normalement atteindre au moins 20 pour cent. Au cas où la substance chimique a des chances de parvenir jusqu'aux eaux marines, au moins l'un des deux dispositifs eau-sédiment doit être d'origine marine.

24. L'étude strictement anaérobie se pratique sur deux sédiments prélevés avec l'eau qui les baigne dans les zones anaérobies des masses d'eau superficielles (7). Les deux phases (sédiment et eau) doivent être manipulées et transportées avec précaution pour éviter toute pénétration d'oxygène.

25. D'autres paramètres sont susceptibles de jouer un rôle important dans la sélection des sédiments et demandent à être examinés au cas par cas. Par exemple, la gamme de pH des sédiments pourrait être significative dans les essais de substances chimiques dont la transformation et/ou la sorption risquent d'être dépendantes du pH. La dépendance de la sorption à l'égard du pH pourrait être indiquée par le pK_a de la substance d'essai.

Caractérisation des échantillons eau-sédiments

26. Les principaux paramètres à mesurer et à consigner (en précisant la méthode utilisée) pour l'eau et le sédiment ainsi que le stade de l'essai auquel ces paramètres doivent être déterminés sont récapitulés dans le tableau qui suit. Des méthodes de détermination de ces paramètres sont données à titre d'information dans les références (15)(16)(17)(18).

27. Il sera parfois nécessaire de mesurer et de rapporter d'autres paramètres, au cas par cas (p. ex. pour l'eau douce : particules, alcalinité, dureté, conductivité NO_3/PO_4 (rapport et valeurs respectives) ; pour les sédiments : capacité d'échange cationique, capacité de rétention d'eau, carbonates, azote et phosphore totaux ; et pour les milieux marins : salinité). L'analyse des nitrates, des sulfates, du fer biodisponible et

³ [argile + limon] désigne la fraction minérale du sédiment dont les particules ont une dimension < 50 μm .

éventuellement d'autres preneurs d'électrons, dans les sédiments et l'eau, peut aussi être utile pour évaluer les conditions d'oxydo-réduction, en particulier pour la transformation anaérobie.

Mesure des paramètres qui caractérisent les échantillons eau-sédiment (7)(19)(20)

Paramètre	Stade de l'essai					
	Prélèvement sur le terrain	post-traitement	début de l'acclimatation	début de l'essai	au cours de l'essai	fin de l'essai
Eau						
Origine/source	x					
Température	x					
pH	x		x	x	x	x
COT			x	x		x
Concentration d'O ₂ *	x		x	x	x	x
Potentiel rédox *			x	x	x	x
Sédiment						
Origine/source	x					
Profondeur de la couche	x					
pH		x	x	x	x	x
Répartition de la dimension des particules		x				
COT		x	x	x		x
Biomasse microbienne**		x		x		x
Potentiel rédox*	Observation (couleur / odeur)		x	x	x	x

* Des recherches récentes ont montré que les mesures de la concentration de l'oxygène dans l'eau et du potentiel rédox n'ont pas de valeur mécaniste ni prévisionnelle pour ce qui est de la croissance des populations de micro-organismes dans les eaux superficielles (21)(22). La détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO, lors du prélèvement sur le terrain, au début et à la fin de l'essai) et des concentrations de micro- et macronutriments Ca, Mg et Mn (au début et à la fin de l'essai) dans l'eau ainsi que la mesure de l'azote et du phosphore totaux dans les sédiments (lors du prélèvement sur le terrain et à la fin de l'essai) pourraient fournir de meilleures indications pour interpréter et évaluer les vitesses et les voies de biotransformation aérobie.

** La méthode de la fréquence respiratoire des micro-organismes (23), la méthode de la fumigation (24) ou le comptage sur plaque (p. ex. bactéries, actinomycètes, champignons et colonies totales) pour les études aérobies ; vitesse de la méthanogenèse pour les études en anaérobiose.

Collecte, traitement et stockage

Collecte

28. Il faut prélever les sédiments conformément au projet de ligne directrice de l'ISO sur l'échantillonnage des sédiments (8). Les échantillons de sédiments sont extraits de la totalité de la couche supérieure de 5 à 10 cm d'épaisseur du sédiment. L'eau qui baigne le sédiment doit être prélevée sur le même site ou au même endroit et en même temps que ce dernier. Pour l'étude anaérobie, le sédiment et l'eau qui le baigne doivent être prélevés et transportés dans des conditions étanches à l'oxygène (25) (voir aussi au paragraphe 24). Des descriptions de matériel de prélèvement ont été publiées (8)(20).

Traitement

29. Le sédiment est séparé de l'eau par filtration, avant d'être tamisé par voie humide à travers des mailles de 2 mm à l'aide de l'excès d'eau provenant du site, laquelle est ensuite éliminée. Ensuite des quantités connues de sédiment et d'eau sont mélangées dans la proportion souhaitée (voir au paragraphe 32) dans des flacons d'incubation et préparées en vue de la période d'acclimatation (voir au paragraphe 31). S'agissant de l'étude anaérobie, toutes les étapes du traitement doivent se dérouler dans des conditions étanches à l'oxygène (26)(27)(28)(29)(30).

Stockage

30. Il est fortement recommandé d'utiliser des sédiments et de l'eau fraîchement récoltés, mais s'il est nécessaire de les stocker, le sédiment et l'eau sont tamisés comme décrit ci-dessus et entreposés dans un même récipient comportant une couche d'eau de 6 à 10 cm d'épaisseur, à l'obscurité, sous une température de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}^4$, durant un délai n'excédant pas quatre semaines (7)(8)(20). Les échantillons destinés aux études aérobies doivent être exposés à l'air (par exemple dans des récipients ouverts), tandis que les échantillons destinés aux études anaérobies doivent être gardés à l'abri de l'oxygène. Durant le transport et le stockage, il faut éviter que le sédiment et l'eau ne gèlent et que le sédiment ne s'assèche.

Préparation des échantillons d'eau et de sédiment en vue de l'essai

31. Avant d'y ajouter la substance d'essai, l'expérimentateur laisse chaque échantillon de sédiment et d'eau s'acclimater dans le flacon d'incubation qui sera utilisé lors de l'essai principal, dans des conditions identiques à celles de l'incubation durant l'essai principal (voir aux paragraphes 32 et 33). L'acclimatation représente le temps nécessaire pour que le système devienne raisonnablement stable, d'après le pH, la concentration d'oxygène dans l'eau, le potentiel rédox des sédiments et de l'eau et la séparation macroscopique des phases. La période d'acclimatation devrait normalement durer une à deux semaines et ne pas dépasser quatre semaines. Les résultats des mesures prises durant cette période doivent être rapportés.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Conditions de l'essai

32. L'essai s'effectue dans un incubateur (voir aux paragraphes 17-19), avec un rapport volumique eau/sédiments compris entre 3:1 et 4:1, et une couche de sédiments de 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm) d'épaisseur. Il est recommandé d'utiliser un minimum de 50 g de sédiment (poids sec) par récipient d'essai.

⁴ Des études récentes ont montré que le stockage à 4°C pouvait conduire à un accroissement de la teneur en carbone organique du sédiment, ce qui pourrait entraîner une diminution de l'activité biologique (31).

33. L'essai se déroule dans l'obscurité, à une température constante comprise entre 10 et 30°C. Une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ est indiquée. Suivant les informations que l'on cherche à tirer de l'essai, on peut envisager au cas par cas de conduire une épreuve supplémentaire à une température inférieure (p. ex. 10 °C). La température d'incubation doit être suivie et rapportée.

Traitement et application de la substance d'essai

34. On ne teste qu'une seule concentration de la substance chimique⁵. Pour les produits phytopharmaceutiques appliqués directement sur les masses d'eau, on utilise la dose maximale indiquée sur l'étiquette du produit, ajustée en fonction de la superficie d'eau dans le flacon expérimental. Dans tous les autres cas, la concentration à utiliser dans l'essai doit être fondée sur les prévisions concernant les émissions dans l'environnement. On veillera soigneusement à choisir une concentration de la substance d'essai permettant de caractériser la voie de transformation ainsi que la formation et le déclin des produits de transformation. Il pourra s'avérer nécessaire d'appliquer des doses plus élevées (p. ex. 10 fois) lorsque la concentration de la substance d'essai se rapproche des limites de détection au début de l'étude et/ou lorsque les principaux produits de transformation sont difficilement détectables au stade où ils représentent 10 pour cent de la concentration d'application de la substance d'essai. Toutefois, si l'on emploie des concentrations plus élevées, celles-ci ne doivent pas perturber sensiblement l'activité microbiologique qui règne dans le système eau-sédiment. Un bon moyen de maintenir constante la concentration de la substance d'essai dans des récipients de dimensions différentes consiste à ajuster la quantité de substance introduite en fonction de la hauteur de la colonne d'eau dans le récipient, elle-même en rapport avec la hauteur de l'eau sur le site (qui est supposée atteindre 100 cm, mais d'autres hauteurs peuvent être appliquées). L'annexe 5 fournit un exemple de calcul.

35. Idéalement, la substance d'essai devrait être appliquée en solution aqueuse dans la phase aqueuse du dispositif expérimental. Pour appliquer et répartir la substance d'essai, l'utilisation d'une faible quantité d'un solvant miscible avec l'eau (comme l'acétone ou l'éthanol) est autorisée si elle est inévitable, mais cette quantité ne doit pas dépasser 1 pour cent en rapport volume/volume, ni nuire à l'activité microbiologique du système expérimental. La solution aqueuse de la substance d'essai doit être parfaitement homogène ; on pourrait à cette fin recourir à une colonne de générateur ou au prémélange. Après avoir ajouté la solution aqueuse au dispositif expérimental, il est recommandé d'agiter doucement la phase aqueuse en remuant le moins possible le sédiment.

36. L'utilisation de préparations chimiques n'est pas recommandée de façon générale, car les ingrédients de la préparation risquent de modifier la répartition de la substance d'essai et/ou des produits de transformation entre l'eau et les sédiments. Mais elle peut toutefois faciliter l'incorporation des substances d'essai peu solubles, le cas échéant.

37. Le nombre de récipients d'incubation dépend du nombre de prélèvements d'échantillons programmés dans le temps (voir au paragraphe 38). L'essai doit comporter un nombre suffisant de dispositifs expérimentaux pour que deux dispositifs puissent être sacrifiés à chaque moment de prélèvement. Si on ajoute des unités témoins pour chaque système de sédiments aquatiques, celles-ci ne doivent pas être traitées avec la substance d'essai. Les unités témoins peuvent servir à déterminer la biomasse microbienne des sédiments et la teneur en carbone organique total de l'eau et des sédiments, à la fin de l'étude. Deux des unités témoins (une unité témoin de chaque sédiment aquatique) peuvent être

⁵ L'essai d'une deuxième concentration peut être utile pour les produits chimiques qui atteignent les eaux superficielles par différentes voies, lesquelles donnent lieu à des concentrations sensiblement différentes, à condition que la concentration la plus faible puisse être analysée avec une précision suffisante.

utilisées pour mesurer en continu les paramètres requis dans les sédiments et l'eau durant la période d'acclimatation (voir le tableau du paragraphe 26). Il faut inclure deux unités témoins supplémentaires si la substance d'essai est véhiculée par un solvant, afin de mesurer les effets néfastes de ce dernier sur l'activité microbiologique du système d'essai.

Durée de l'essai et prélèvements

38. L'essai ne doit normalement pas dépasser 100 jours (6) et se poursuivre jusqu'à ce que la voie de dégradation et le mode de répartition dans l'eau et les sédiments aient été mis en évidence, ou jusqu'à la dissipation de 90 pour cent de la substance d'essai par transformation et/ou volatilisation. Il doit y avoir au moins six moments de prélèvement (prélèvement au temps zéro compris). Si les études précédentes ne livrent pas assez de données sur la substance d'essai, une étude préliminaire facultative (voir au paragraphe 40) permettrait d'établir le régime de prélèvement approprié et la durée de l'essai. Dans le cas des substances d'essai hydrophobes, il pourra s'avérer nécessaire d'ajouter des moments de prélèvement au cours de la période initiale de l'étude pour déterminer le taux de répartition entre l'eau et les sédiments.

39. Aux heures de prélèvement prévues, l'expérimentateur retire deux récipients d'incubation pour les analyser. Les sédiments et l'eau surnageante sont analysés séparément⁶. En prélevant l'eau surnageante, on prendra soin de remuer le moins possible les sédiments. L'extraction et la caractérisation de la substance d'essai et des produits de transformation doivent s'effectuer suivant les méthodes d'analyse adéquates. Il faut aussi enlever les substances qui seraient adsorbées sur le récipient d'incubation ou le tube de connexion utilisé pour piéger les produits volatils.

Étude préliminaire facultative

40. Si les autres études conduites sur la substance d'essai ne permettent pas d'établir la durée de l'essai et le régime de prélèvement, il pourrait être utile d'effectuer un essai préliminaire, facultatif, dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'essai principal. Les conditions expérimentales pertinentes et les résultats de l'étude préliminaire seront rapportés succinctement, le cas échéant.

Mesures et analyses

41. La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation dans l'eau et les sédiments relevée à chaque prélèvement est consignée dans le rapport (en termes de concentration et de pourcentage de la concentration appliquée au départ). À chaque prélèvement, il faut généralement identifier les produits de transformation détectés à une concentration supérieure ou égale à 10 pour cent de la radioactivité introduite dans la totalité du système eau-sédiment, sauf si un motif raisonnablement justifié s'y oppose. L'identification des produits de transformation dont la concentration ne cesse d'augmenter durant l'étude est à envisager, même si leurs concentrations ne dépassent pas les limites indiquées plus haut, car cela peut être un indice de persistance. Cet aspect doit être jugé au cas par cas et les décisions prises justifiées dans le rapport.

42. Les mesures opérées à chaque prélèvement sur les pièges à gaz et à substances volatiles (CO₂ et autres, c'est-à-dire les composés organiques volatils) doivent être rapportées, de même que les vitesses de minéralisation. Le rapport mentionnera aussi les résultats concernant les résidus non extractibles (fixés) dans les sédiments, obtenus à chaque prélèvement.

⁶ Dans les cas où une réoxydation rapide des produits de transformation anaérobies peut facilement avoir lieu, il faut maintenir l'anaérobiose pendant le prélèvement et l'analyse.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats et calculs

43. On calcule le bilan massique total ou la récupération (voir au paragraphe 13) de la radioactivité ajoutée, pour chaque prélèvement. Les résultats doivent être libellés en pourcentage de radioactivité ajoutée. La répartition de la radioactivité entre l'eau et les sédiments est mentionnée en concentrations et en pourcentages, pour chaque prélèvement.

44. La demi-vie, le TD₅₀ et, s'il y a lieu, le TD₇₅ et le TD₉₀ de la substance d'essai doivent être calculés avec leurs intervalles de confiance (voir au paragraphe 16). Des informations sur la vitesse de dissipation de la substance d'essai dans l'eau et les sédiments peuvent être obtenues au moyen d'outils d'évaluation appropriés. Ces derniers englobent l'application d'une pseudo-cinétique de premier ordre, des techniques empiriques d'ajustement des courbes qui appliquent des solutions graphiques ou numériques et des évaluations plus complexes qui utilisent, par exemple, des modèles à un ou plusieurs compartiments. Des détails supplémentaires sont donnés dans les publications sur ce sujet (32)(33)(34).

45. Toutes les approches ont leurs avantages et leurs inconvénients et varient considérablement en complexité. La description des phénomènes de dégradation et de répartition par une cinétique de premier ordre risque de les simplifier excessivement, mais donne en revanche, si elle est possible, une expression (la constante de vitesse ou la demi-vie) facile à comprendre et utile à la modélisation et aux calculs qui permettent de prévoir les concentrations dans l'environnement. Les méthodes empiriques ou de transformation linéaire peuvent produire des courbes mieux ajustées aux résultats et fournir ainsi une meilleure estimation des demi-vies, du TD₅₀ et, selon les besoins, du TD₇₅ et du TD₉₀. L'utilisation des constantes dérivées est cependant limitée. Les modèles à compartiments peuvent livrer plusieurs constantes utiles à l'évaluation des risques, qui décrivent la vitesse de dégradation dans les différents compartiments et la répartition de la substance chimique. Ils devraient aussi être utilisés pour estimer les constantes de vitesse de la formation et de la dégradation des principaux produits de transformation. Quoi qu'il en soit, la méthode choisie doit être justifiée et il appartient à l'expérimentateur de démontrer graphiquement et/ou statistiquement la pertinence de l'ajustement.

Rapport d'essai

46. Le rapport doit fournir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nom courant, nom chimique, numéro du CAS, formule développée (indiquant la position du/des marqueur(s), le cas échéant) 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).

Substances de référence :

- nom chimique et structure des substances de référence employées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation.

Eaux et sédiments testés :

- localisation et description du ou des sites de prélèvement des sédiments aquatiques et, si possible, historique de la contamination du site ;
- toute information se rapportant à la collecte, au stockage (le cas échéant) et à l'acclimatation des systèmes eau-sédiments ;
- caractéristiques des échantillons d'eau-sédiments, d'après le tableau du paragraphe 26.

Conditions d'essai :

- système expérimental utilisé (p. ex. dynamique, biométrique ; technique de ventilation, méthode d'agitation, volume d'eau, masse des sédiments, épaisseur de la couche d'eau et de sédiments, dimensions des récipients d'essai, etc.) ;
- ajout de la substance d'essai au système : concentration d'essai appliquée, nombre d'exemplaires et de témoins, mode d'ajout de la substance d'essai (p. ex. utilisation d'un solvant), etc. ;
- température d'incubation ;
- moments de prélèvement ;
- méthodes et rendements d'extraction, méthodes d'analyse et limites de détection ;
- méthodes de caractérisation et d'identification des produits de transformation ;
- tout écart du protocole expérimental ou des conditions d'essai au cours de l'étude.

Résultats :

- données numériques brutes des analyses représentatives (toutes les données brutes doivent être consignées dans le dossier des bonnes pratiques de laboratoire) ;
- répétabilité et sensibilité des méthodes d'analyse ;
- taux de récupération (les pourcentages qui indiquent que l'étude est valable sont reproduits au paragraphe 13) ;
- tableaux des résultats exprimés en pourcentage de la dose appliquée et en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dans l'eau, les sédiments et l'ensemble du système (pourcentage seulement) pour la substance d'essai et, s'il y a lieu, pour les produits de transformation et la radioactivité non-extractible ;
- bilan massique pendant et à la fin des études ;
- représentation graphique de la transformation, y compris la minéralisation, dans les fractions aqueuse et sédimentaire et dans l'ensemble du système ;
- vitesses de minéralisation ;
- demi-vie, TD_{50} et, s'il y a lieu, TD_{75} et TD_{90} pour la substance d'essai et, le cas échéant, les produits de transformation, ainsi que leurs intervalles de confiance dans l'eau, les sédiments et dans l'ensemble du système ;
- 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 ;
- interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (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 (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada ; chimie et devenir dans l'environnement. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 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). Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 12: Guide général pour l'échantillonnage des sédiments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) OECD (1993). Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (11) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.
- (12) 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.
- (13) 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, 631-637.
- (14) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.
- (15) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

- (16) 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.
- (17) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (18) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.
- (19) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.
- (20) 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.
- (21) 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, 2858-2868.
- (22) 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., 329-338.
- (23) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.
- (24) ISO-14240-2. (1997). Qualité du sol – Détermination de la biomasse microbienne du sol - Partie 2 : Méthode par fumigation-extraction.
- (25) 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), 13-21.
- (26) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.
- (27) 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.
- (28) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemosphere 27, 1499-1509.
- (29) 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, 3597-3603.
- (30) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

- (31) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961-968.
- (32) 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, 187 - 203.
- (33) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 33, 47 - 60.
- (34) 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*, pp 1349-1354.

ANNEXE 1COMPLÉMENT D'INFORMATION SUR LES DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX
AÉROBIE ET ANAÉROBIE**Dispositif expérimental aérobie**

Le dispositif aérobie décrit dans cette Ligne directrice comporte une couche d'eau aérobie (concentration d'oxygène généralement comprise entre 7 et 10 mg·L⁻¹) et une couche de sédiment, aérobie en surface et anaérobie en dessous de la surface (le potentiel rédox moyen (E_h) dans la zone anaérobie du sédiment varie habituellement entre -80 et -190 mV). De l'air humidifié est insufflé à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation de façon à maintenir suffisamment d'oxygène dans l'espace libre.

Dispositif expérimental anaérobie

Pour le dispositif anaérobie, on procède pratiquement de la même manière que pour le dispositif aérobie, si ce n'est qu'on insuffle de l'azote humidifié à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir un espace libre formé d'azote. Le sédiment et l'eau sont considérés comme anaérobies à partir du moment où le potentiel rédox (E_h) est inférieur à -100 mV.

Dans l'essai anaérobie, l'évaluation de la minéralisation implique une mesure du dégagement de méthane et de dioxyde de carbone.

ANNEXE 2DÉFINITIONS ET UNITÉS

On utilise toujours les unités du Système d'unités international (SI).

Substance d'essai : le produit parent ou ses produits de transformation pertinents.

Produits de transformation : toutes les substances issues des réactions de transformation biologiques et non biologiques de la substance d'essai, y compris le CO₂ et les résidus fixés.

Résidus fixés : les "résidus fixés" sont les substances présentes dans le sol, les plantes ou les animaux, qui subsistent dans la matrice sous la forme du produit parent ou de ses métabolites et produits de transformation, après l'extraction. La méthode d'extraction ne doit pas trop altérer les produits ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être en partie élucidée par des méthodes d'extraction modifiant la matrice et des techniques d'analyse complexes. À ce jour, par exemple, les liaisons ioniques covalentes et les liaisons de sorption, de même que le piégeage d'une molécule, ont été identifiés de cette manière.

En général, la formation de résidus fixés diminue sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (1) [d'après UICPA 1984 (2)].

Transformation aérobie (oxydante) : réactions ayant lieu en présence d'oxygène moléculaire (3).

Transformation anaérobie (réductrice) : réactions ayant lieu en l'absence d'oxygène moléculaire (3).

Eaux naturelles : eaux superficielles prélevées dans les étangs, les cours d'eau, etc.

Sédiments : mélange de substances minérales et organiques, ces dernières incluant des espèces de poids moléculaire élevé à forte proportion de carbone et d'azote. Ils sont déposés par les eaux naturelles et ont une interface commune avec ces eaux.

Minéralisation : dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et H₂O en aérobie, et en CH₄, CO₂ et H₂O en anaérobie. Dans le cadre de cette Ligne directrice, lorsqu'on utilise un produit marqué au ¹⁴C, la minéralisation consiste en une dégradation poussée d'une molécule au cours de laquelle l'atome de carbone radioactif est oxydé ou réduit en ¹⁴CO₂ ou ¹⁴CH₄, selon le cas.

- (1) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (2) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (3) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : 304 A : Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

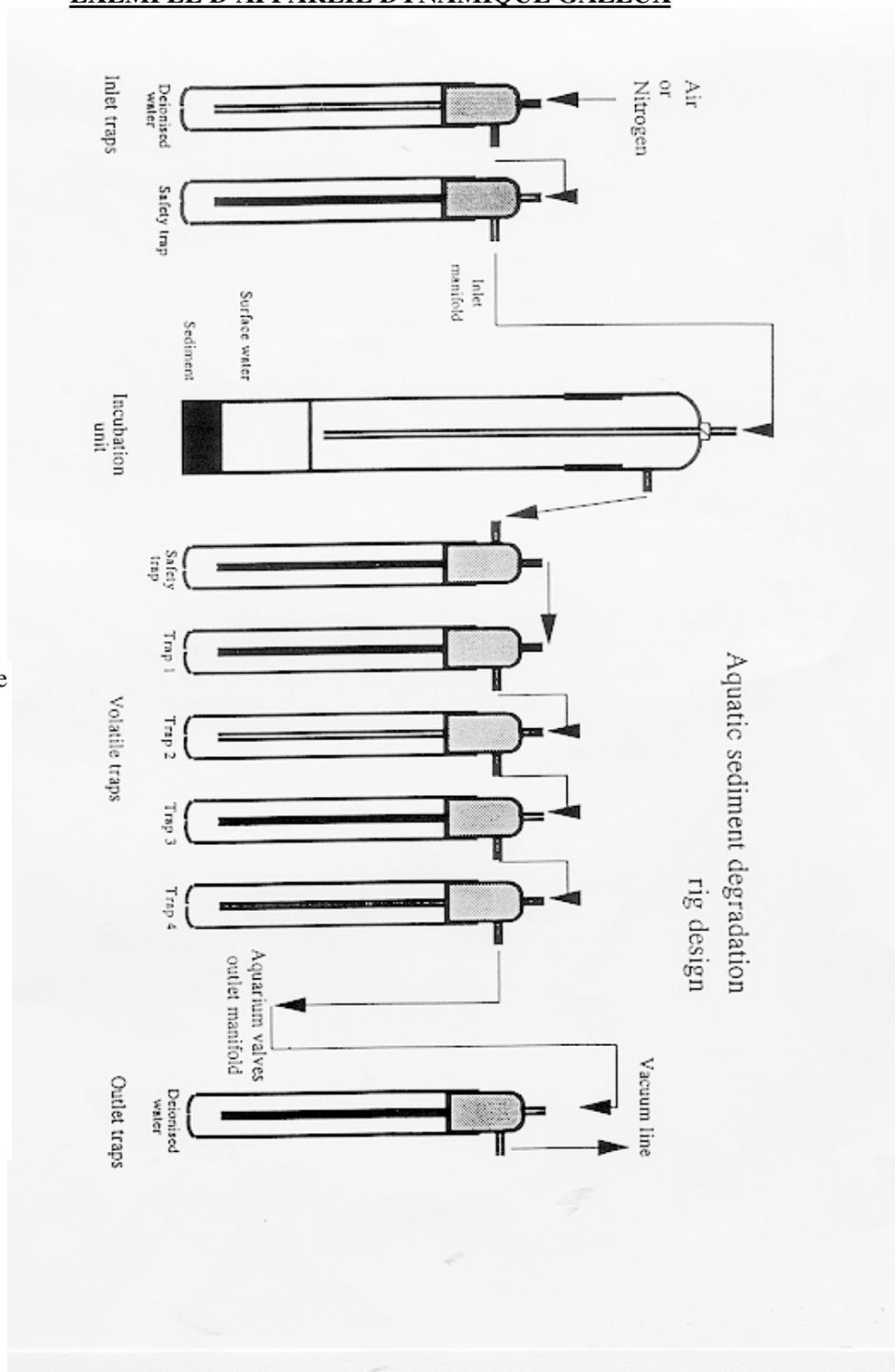
ANNEXE 2 (suite)

Demi-vie, $t_{0.5}$: temps nécessaire à la transformation de 50 pour cent d'une substance d'essai lorsque la transformation obéit à une cinétique de premier ordre ; elle est indépendante de la concentration initiale.

TD₅₀ (Temps de disparition 50) est la durée correspondant à une diminution de 50 pour cent de la concentration initiale de la substance d'essai.

TD₇₅ (Temps de disparition 75) est la durée correspondant à une diminution de 75 pour cent de la concentration initiale de la substance d'essai.

TD₉₀ (Temps de disparition 90) est la durée correspondant à une diminution de 90 pour cent de la concentration initiale de la substance d'essai.

ANNEXE 3EXEMPLE D'APPAREIL DYNAMIQUE GAZEUX

Piège de sécurité, vide

Piège 1:
éthylèneglycol
pour piéger les
substances
organiques
volatiles

Piège 2:
acide sulfurique
0,1 M pour piéger
les produits
alcalins volatils

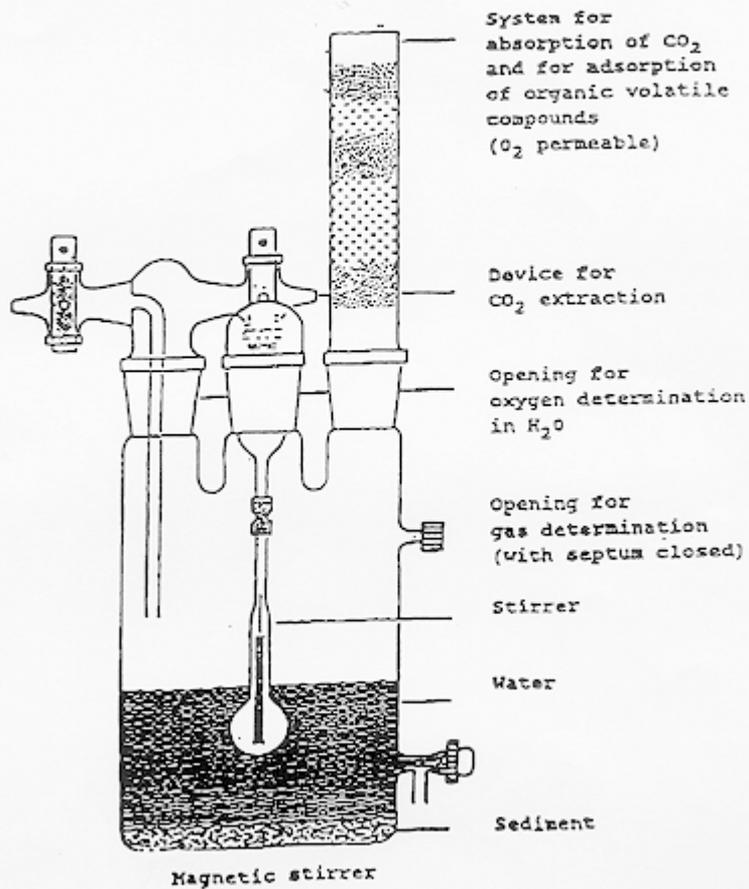
ANNEXE 4

EXEMPLE DE BIOMÈTRE

Piège de sécurité, vide

Piège 1:
éthylèneglycol
pour piéger les
substances
organiques
volatiles

Piège 2:
acide sulfurique
0,1 M pour piéger
les produits



ANNEXE 5EXEMPLE DE CALCUL DE LA DOSE À INTRODUIRE DANS LES RÉCIPIENTS D'ESSAI

Diamètre interne du cylindre :	= 8 cm
Hauteur de la colonne d'eau sans inclure les sédiments :	= 12 cm
Superficie : $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Dose: 500 g de substance d'essai/ha correspond à 5 µg/cm ²	
Total µg: 5 x 50,3	= 251,5 µg
Ajuster la quantité à une hauteur de 100 cm : 12 x 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Volume de la colonne d'eau: 50,3 x 12	= 603 mL
Concentration dans l'eau : 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/mL ou 50 µg/L