

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

Minéralisation aérobie dans les eaux superficielles **Essai de simulation de la biodégradation**

INTRODUCTION

1. 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 (1) et reprend des éléments des Lignes directrices 307 et 308 de l'OCDE (2)(3). 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 forme 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 60 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.

2. Dans cet essai, on entend par faible concentration (par exemple inférieure à $1 \mu\text{g/l}$ - $100 \mu\text{g/l}$), 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 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 pseudo-cinétique de premier ordre acceptant une constante de vitesse dépendante de la concentration.

3. 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 d'interpréter les 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.

4. Les définitions et les unités employées figurent à l'Annexe 1.

PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'ESSAI

5. On conduit 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 $\mu\text{g/l}$, mais il est préférable d'appliquer des concentrations maximales inférieures à 10 $\mu\text{g/l}$ pour s'assurer que la biodégradation obéit à une cinétique de premier ordre. La concentration la plus faible ne devrait pas dépasser 10 $\mu\text{g/l}$, mais il vaut mieux choisir une concentration minimale de 1 à 2 $\mu\text{g/l}$ ou inférieure à 1 $\mu\text{g/l}$. Une concentration aussi faible peut normalement être correctement analysée avec des substances marquées au ^{14}C 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 $\leq 100 \mu\text{g/l}$ (voir paragraphe 15). Des concentrations plus élevées de la substance d'essai ($>100 \mu\text{g/l}$ et quelquefois $>1 \text{ mg/l}$) 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.

6. La dégradation est suivie, à des intervalles de temps appropriés, par la mesure du ^{14}C résiduel ou de la concentration résiduelle de la substance d'essai lorsqu'on utilise une méthode spécifique d'analyse chimique. Le marquage au ^{14}C de la partie la plus stable de la molécule permet de déterminer la minéralisation totale, tandis que le marquage au ^{14}C d'une partie moins stable de la molécule, ainsi 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 ^{14}C , dans le groupement fonctionnel, afin de suivre l'élimination de la propriété particulière.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

7. 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 4). Pour la détermination de la cinétique de biodégradation, les concentrations de la substance d'essai doivent être inférieures à sa solubilité 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, d'établir la solubilité des substances d'essai particulièrement peu solubles dans l'eau en utilisant les eaux naturelles mises à l'essai.

8. 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»).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

9. Cet essai convient aussi bien aux substances radiomarquées que non marquées. Le marquage recommandé est celui au ^{14}C et devrait normalement s'effectuer sur la ou les parties les plus stables de la molécule (voir au paragraphe 6). 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 ^{14}C 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%. S'agissant des substances radiomarquées, une activité spécifique d'au moins quelque $50 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ ($1,85 \text{ MBq}$) est préférable pour faciliter la mesure du ^{14}C dans les essais conduits avec de faibles concentrations initiales. Les informations suivantes sur la substance d'essai devraient être connues :

- solubilité dans l'eau [Ligne directrice 105 de l'OCDE] (4) ;
- 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 112 de l'OCDE] (4) ;
- pression de vapeur [Ligne directrice 104 de l'OCDE] (4) et constante de Henry ;
- stabilité chimique dans l'eau et dans l'obscurité (hydrolyse) [Ligne directrice 111 de l'OCDE] (4).

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.

10. Si l'essai est un «essai en suspension de sédiments», on devrait également disposer des informations suivantes :

- coefficient de partage n-octanol/eau [Lignes directrices 107, 117 de l'OCDE] (4) ;
- coefficient d'adsorption [Ligne directrice 106 de l'OCDE] (4).

11. Parmi les autres renseignements utiles, citons :

- la concentration dans la nature, si elle est connue ou estimée ;

- la toxicité de la substance d'essai à l'égard des microorganismes [Ligne directrice 209 de l'OCDE] ;
- la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque [Lignes directrices 301, 302 de l'OCDE] ;
- la biodégradabilité aérobie ou anaérobie dans le sol et les études de transformation sédiment/eau [Lignes directrices 307, 308 de l'OCDE].

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

12. Il convient d'utiliser une substance de référence qui, normalement, se dégrade facilement en aérobiose (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.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Récupération

13. 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. S'agissant des substances d'essai marquées au ^{14}C , le taux de récupération à la fin de l'expérience est fourni par le bilan massique (voir au paragraphe 39). Idéalement, le bilan massique radiomarké 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.

Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique

14. La répétabilité de la méthode analytique (notamment de 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.

15. 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 $>100 \mu\text{g/l}$.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Matériel

16. L'essai peut être conduit 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 CO₂ (avec des bouchons cloisonnés, septa, 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 paragraphe 30). 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 paragraphe 29). 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 ;
- 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 ;
- instruments permettant de manipuler les substances marquées au ¹⁴C ;
- appareil permettant de quantifier l'activité du ¹⁴C dans des échantillons de solutions piégeant le CO₂ et, si nécessaire, dans des échantillons de sédiment ;
- 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).

Solutions mères de la substance d'essai

17. Les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence sont préparées avec de l'eau désionisée (voir aussi au paragraphe 22). 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 (5).

Prélèvement et transport de l'eau de surface

18. 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 53). 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 2 ou 3 heures. Il ne faut pas congeler l'échantillon d'eau.

Stockage et préparation de l'eau superficielle

19. 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 4 semaines. L'échantillon d'eau devrait être conservé à 4°C, sous aération, jusqu'à son 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.

Préparation de l'eau additionnée de sédiment (facultatif)

20. 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 19), 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 (2). 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 2 à 3 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 4 semaines.

Procédé semi-continu (facultatif)

21. Il peut s'avérer nécessaire de prolonger l'incubation (de plusieurs mois) si une dégradation sensible de la substance d'essai ne peut être mesurée qu'après une longue période de latence. Si un essai antérieur a révélé que tel était le cas de la substance d'essai, l'essai peut débuter par un procédé semi-continu, consistant dans le renouvellement périodique d'une partie de l'eau ou de la suspension d'essai (voir Annexe 3). 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 au paragraphe 27).

Ajout de la substance d'essai (ou de référence)

22. 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 17) : 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.

23. 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 (5). 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 (6) et (7). 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.

Conditions expérimentales

Température

24. L'incubation devrait avoir lieu dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse, à une température réglée ($\pm 2^\circ\text{C}$), 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.

Agitation

25. 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.

Durée de l'essai

26. L'essai ne devrait normalement pas dépasser 60 jours, à moins qu'on ait opté pour le procédé semi-continu avec renouvellement périodique de la suspension expérimentale (voir paragraphe 21 et Annexe 3). La durée de l'essai semi-continu peut-être prolongée 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 mesurée à une fréquence appropriée, d'après l'activité du ^{14}C résiduel ou du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé (voir paragraphes 35-39) et/ou par analyse chimique (paragraphes 40-42). 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.

27. Le pH et la concentration d'oxygène sont à mesurer périodiquement dans le système expérimental, à moins qu'une expérience acquise avec des essais identiques menés sur des échantillons d'eau et de sédiments prélevés sur le même site ne rende ces mesures superflues. Sous 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 CO_2 et une diminution d'oxygène tels qu'ils modifieraient sensiblement les conditions expérimentales durant l'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation des flacons destinés à l'essai pélagique

28. On transfère un volume approprié d'au moins quelque 100 ml d'eau d'essai dans les flacons expérimentaux, jusqu'à les remplir environ jusqu'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 17, 22 et 23. 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.

29. 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 16), à condition que les principaux produits de dégradation ne soient pas connus pour être volatils et de pratiquer une détermination indirecte du CO₂ (voir Annexe 4).

30. Les flacons sont incubés à la température choisie (voir paragraphe 24). 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 13), 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 4). 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 de conduire 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 plus d'échantillons et de sélectionner ensuite ceux à analyser à la fin de l'expérience dans un ordre renversé, à savoir que les derniers échantillons seront analysés en premier (le paragraphe 41 donne des conseils sur la façon de préserver la stabilité des échantillons durant le stockage).

Nombre de flacons et d'échantillons

31. 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 3) 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) ;
- flacons d'essai pour le calcul du bilan massique : au moins deux flacons pour chaque concentration expérimentale (symbolisés par F_M) ;

- témoin sans substance d'essai : au moins un flacon ne contenant que l'eau d'essai (symbolisé par F_B) ;
- témoins de référence : deux flacons contenant la substance de référence (aniline ou benzoate de sodium, par exemple, à 10 $\mu\text{g/l}$) (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 ;
- témoin stérile ; un ou deux flacons contenant de l'eau d'essai stérilisée pour vérifier l'existence éventuelle d'une dégradation abiotique ou une d'autre élimination non biologique de la substance d'essai (symbolisé 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 faut 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.
- 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.

32. 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 aussi les paragraphes 30 et 35-39 ainsi que l'Annexe 4).

33. 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 paragraphe 28).

Préparation des flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments (facultatif)

34. On verse les volumes nécessaires d'eau d'essai et de sédiments, le cas échéant, dans les flacons expérimentaux (voir paragraphe 20). 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 28-33). On utilise de préférence des bouteilles à serum 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 aérobiose adéquate.

Déterminations radiochimiques

35. Le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé se mesure directement et indirectement (voir Annexe 4). Le $^{14}\text{CO}_2$ est dosé 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 enlevé 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 4). Si possible, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ est mesuré directement (voir Annexe 4) 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 conduits avec des flacons fermés.

36. Si le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé est mesuré directement au cours de l'essai, il faut prévoir un plus grand nombre de flacons 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 4).

37. 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.

38. On peut, si on le souhaite, déterminer la répartition entre les phases de la radioactivité restante (voir Annexe 2), ainsi que de la substance d'essai résiduelle et des produits de transformation.

39. 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 séparés d'où aucun échantillon n'a été prélevé au cours de l'essai (voir Annexe 4).

Analyse chimique spécifique

40. 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 60 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 soit raisonnablement justifiable. 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 au 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.

41. 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 conduite dans les 24 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 24 heures et conservés au-delà de ce délai, une étude de stabilité du stockage doit être conduite 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 24 heures au maximum.

42. Suivant la sensibilité de la méthode analytique, il pourra être nécessaire de prélever des échantillons d'un volume supérieur à celui indiqué au paragraphe 16. Il est facile de conduire 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.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

Représentation des résultats sur un tracé

43. 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 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.

44. 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 de \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 faudrait 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, lorsque l'on recueille des flacons entiers à chaque moment de prélèvement (voir paragraphe 33). Si l'on applique le premier procédé mentionné, la constante de vitesse et la demi-vie doivent être rapportées individuellement pour chacun des flacons des expériences identiques 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 pseudo-cinétique de 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 que le 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.

45. 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 .

46. 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.

Activité résiduelle

47. 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 prolongeront 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 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 d'estimation des 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 (1)(8)(9)(10). Ces procédés s'appliquent le plus facilement aux substances rapidement dégradables.

Interprétation des résultats

48. 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.

49. 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 conduit à une concentration plus élevée de la substance d'essai.

50. Les déterminations indirecte et directe du $^{14}\text{CO}_2$ (paragraphe 35-39 et Annexe 4) ne peuvent être utilisées que pour mesurer l'ampleur de la minéralisation de la substance d'essai en CO_2 . La radiochromatographie sur 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 (paragraphe 37). 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 principaux produits de transformation (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 paragraphe 40), 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 minimum 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 2). 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.

Validité de l'essai

51. 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 jours⁻¹, avec une moyenne de 0,8 jour⁻¹ à 20°C et un écart-type de $\pm 0,4$ jour⁻¹ ($t_{1/2} = 0,9$ jour). Les périodes de latence étaient généralement comprises entre 1 et 7 jours. Les eaux examinées renfermaient une biomasse bactérienne correspondant à 10^3 à 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.

52. La récupération totale (bilan massique) à la fin de l'expérience devrait se situer entre 90% et 110% pour les substances radiomarquées, 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.

Rapport d'essai

53. 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, formules structurales (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 9-12) ;

- noms chimiques, numéros CAS, formules 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 faut rapporter, 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 saumâtre) ;
- solides en suspension (dans le cas d'un échantillon trouble) ;
- éventuellement d'autres informations pertinentes sur le lieu de prélèvement au moment du prélèvement (par exemple des données actuelles ou antérieures sur le débit des cours d'eau ou les courants marins, la présence d'importantes sources de rejets à proximité et la nature des rejets, les 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) ;
- carbone minéral ;
- estimation de la biomasse des algues d'après la concentration en chlorophylle a.

Si l'essai est conduit 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, sable fin, limon et 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 et l'utilisation dans l'essai en laboratoire, stockage de l'échantillon 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 l'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 aux mesures radiochimiques, à la vérification du bilan massique et à la détermination de la répartition entre les phases (le cas échéant) ;
- nombre d'expériences identiques ;

Résultats :

- pourcentages de récupération (voir paragraphe 13) ;
- répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées, y compris les seuils de détection et de quantification (voir paragraphes 14 et 15) ;
- 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 d'une expérience identique, rapporter 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, $t_{1/2}$) ;
- valeurs pertinentes telles que les moyennes des résultats observés pour chaque expérience identique, par exemple la longueur de la phase de latence, la constante de vitesse de dégradation et la demi-vie de dégradation (ou $t_{1/2}$) ;
- établir 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 conduites, le niveau final de la dégradation primaire ;
- identification, concentration molaire et pourcentage des principaux produits de transformation (voir paragraphe 40), le cas échéant ;
- proposition d'un chemin réactionnel pour la transformation, s'il y a lieu ;
- analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) 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.
- (2) OECD draft (1999). Guidelines for the testing of chemicals. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment. OECD, Paris.

- (3) OECD draft (1999). Guidelines for the testing of chemicals. Aerobic and anaerobic transformation in soil. OECD, Paris.
- (4) OCDE (1993). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
- (5) ISO 8245 (1999). Qualité de l'eau – Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et du carbone organique dissous (COD).
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralisation kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 394-401.
- (9) Ingerslev, F. and Nyholm, N. (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.
- (10) ISO/CD 14592-1 (1999). Rapport d'essai tournant : Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations – Partie 1 – rapport de l'essai tournant de 1998/1999 : Essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

ANNEXE 1DÉFINITIONS ET UNITÉS

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.

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} (d) : 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 $0,20 - 0,45\ \mu\text{m}$ 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.

ANNEXE 2RÉPARTITION DU ¹⁴C ENTRE LES PHASES

Afin de contrôler le procédé employé, il faudrait étayer les mesures régulières de l'activité totale du ¹⁴C organique (AOT) résiduel par des mesures du bilan massique comportant une détermination directe du ¹⁴CO₂ dégagé, piégé dans un absorbeur (voir Annexe 4). En elle-même, la formation de ¹⁴CO₂ 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 ¹⁴C organique dissous, AOD) et la phase particulaire (activité du ¹⁴C 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 ¹⁴C 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 ¹⁴C 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 centrifugeat sont traités comme les échantillons non filtrés (voir à l'Annexe 4). 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 resuspendre 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.

ANNEXE 3PROCÉDÉ 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 débiter 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 conduit 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 on a ajouté la quantité requise de substance d'essai pour rétablir sa concentration initiale. De même qu'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 conduit 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 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 la concentration initiale de la substance d'essai n'est pas dépassée par le renouvellement partiel de la suspension d'essai, et qu'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 :

$C_e/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1/(1 + K_{co} \times f_c \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$

ANNEXE 4DÉTERMINATION 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 1/2 heure à 1 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 soit très colorée ou renferme une concentration élevée de particules, les échantillons présentent normalement une extinction uniforme et il suffira 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 être 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 pour les boues d'essai, décrite plus bas, 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 resuspendant 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 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.

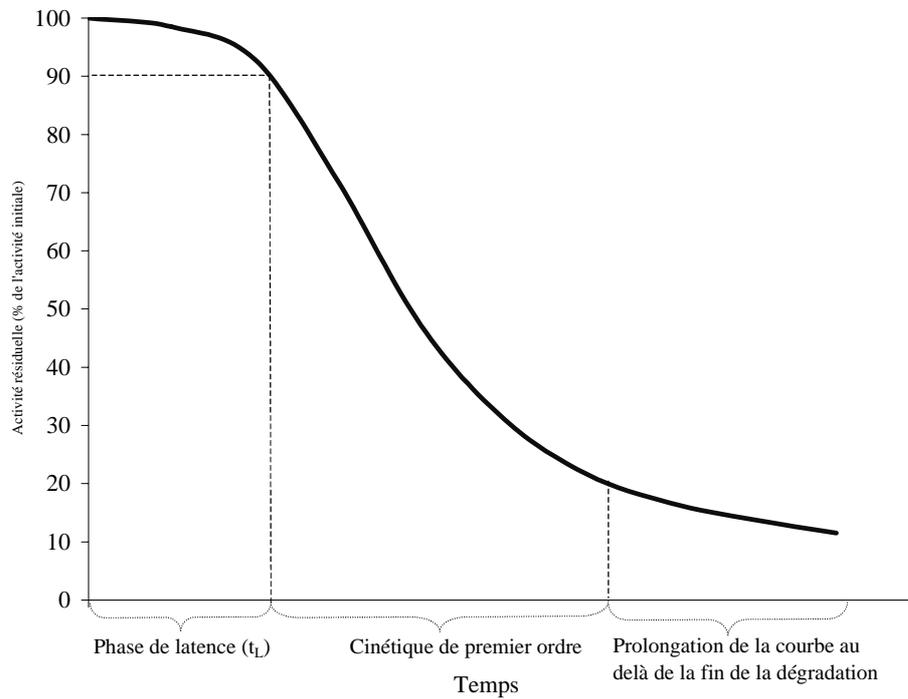


Figure 1a. Exemple d'un tracé arithmétique des résultats (activité résiduelle en fonction du temps)

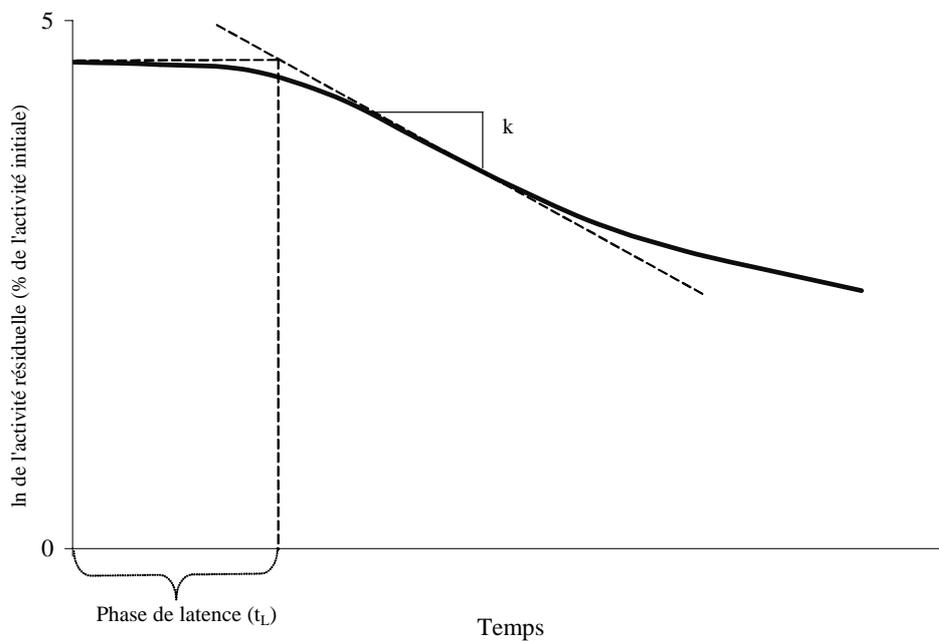


Figure 1b. Exemple de tracé semi-logarithmique des résultats (ln de l'activité résiduelle en fonction du temps)