



304A

Adoptée :
12 mai 1981

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

« **Biodégradabilité Intrinsèque dans le Sol** »

1. INTRODUCTION

• Condition requise

- Il est nécessaire de disposer d'un produit marqué au ¹⁴C.

• Informations générales

- Pour l'interprétation des données obtenues, il est utile de disposer d'informations sur la toxicité du composé étudié. La concentration de ce composé peut alors être adaptée selon ces renseignements.

• Conditions particulières

- L'essai est applicable aux composés volatils ou non, solubles ou non, qui n'ont pas d'effet inhibiteur sur les micro-organismes. Le taux de minéralisation se rapporte uniquement à la carbonatation des atomes marqués. C'est pourquoi, le site du marquage à l'intérieur de la molécule, ainsi que la spécificité de ce marquage nécessitent un examen sérieux.

• Recommandations

- Les résultats obtenus en utilisant l'essai de minéralisation de base peuvent être confirmés par la détermination du taux d'évaporation du composé de départ et de quelques uns de ses métabolites volatils possibles, ainsi que par la détermination de résidus du sol, extractibles et non-extractibles. Ces deux essais qui peuvent être utilisés au choix sont décrits dans cette Ligne directrice d'essais.
- Il est parfois recommandé d'obtenir des informations sur la dégradation chimique dans des conditions anaérobies. C'est pourquoi, conformément à la description ci-dessous, dans le flacon du biomètre contenant l'échantillon de sol (un préconditionnement n'est pas nécessaire), on introduit de l'eau (couche de 2-3 cm) pour éviter les pertes, puis on la vide et on fait passer de l'azote plusieurs fois. La dégradation peut être évaluée en mesurant le dégagement de méthane et en déterminant le taux de carbone ¹⁴ à la fois dans l'eau et dans le sol.

- Documents de référence

Cette Ligne directrice pour les essais est basée sur la méthode citée dans la référence 1 du paragraphe 4, bibliographie.

2. MÉTHODE

A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE, APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI

La méthode décrite dans cette Ligne directrice est destinée à l'évaluation du taux de minéralisation dans le sol d'un composé marqué au ^{14}C . Cette méthode est applicable aux composés volatils ou non, solubles ou non, qui n'inhibent pas les micro-organismes.

- Définitions et unités

Le sol est un mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote, et à poids moléculaire élevé, contenant de petits (principalement micro) organismes. Le sol peut être manipulé sous deux formes :

- a) non brassé, tel qu'il s'est formé au cours du temps, en couches caractéristiques d'un grand nombre de types de sols,
- b) brassé, tel qu'il est habituellement recueilli en creusant et tel qu'il est utilisé dans l'essai décrit ici.

La minéralisation (dans ce contexte) désigne la dégradation importante d'une molécule, au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de $^{14}\text{CO}_2$.

- Substances de référence

Quand on étudie une nouvelle substance, des produits de référence peuvent parfois se révéler utiles ; on ne peut cependant pas encore recommander de substance de référence particulière. Quand on étudie une nouvelle substance, il n'est pas nécessaire d'utiliser à chaque fois des substances de référence. Elles sont surtout utiles pour pouvoir étalonner la méthode de temps en temps, et pour permettre de comparer les résultats obtenus avec une autre méthode.

« Biodégradabilité Intrinsèque dans le Sol »

- Principe de la méthode

Essai de base : Un petit échantillon de sol est traité avec le produit à étudier marqué au ^{14}C , dans un flacon biomètre. On mesure le $^{14}\text{CO}_2$ qui se dégage du produit chimique d'essai grâce à l'absorption sur alcalis et à un comptage par scintillation liquide.

Des expériences facultatives incluent les essais suivants :

Essai d'évaporation : Quand on teste des produits chimiques dont la tension de vapeur est supérieure à 0,0133 Pa, on place à l'intérieur du flacon biomètre un tampon en mousse de polyuréthane afin d'absorber la partie volatile marquée du composé de départ et des métabolites volatils et de pratiquer un comptage par scintillation liquide.

Essai de résidu : Quand 50 pour cent de la minéralisation est réalisée, on peut faire une extraction sur le sol étudié. La partie extractible du composé, ainsi que ses métabolites restés dans le sol, peuvent être analysés par scintillation liquide. On peut, de plus, obtenir des données sur la partie liée au résidu en mesurant le $^{14}\text{CO}_2$ libéré après combustion du sol.

- Critères de qualité

Reproductibilité

La reproductibilité est bonne si les conditions-standard, en particulier le préconditionnement du sol sont strictement observées.

Sensibilité

L'évaluation de la sensibilité n'est pas significative parce que, pour chaque expérience, on utilise une quantité modérée de produits chimiques marqués au ^{14}C correspondant à 37-187 kBq ($\cong 1-5 \mu\text{Ci}$).

Spécificité

La méthode n'est applicable que si l'on dispose de produits chimiques marqués au ^{14}C . La spécificité est très bonne.

Possibilité de normalisation

Ce procédé est normalisé dans une certaine limite. Cette limite est en relation avec la difficulté de normalisation des échantillons de sol entre laboratoires.

Possibilité d'automatisation

N'a pas été prévue.

B. MODE OPÉRATOIRE

• Préparations

Appareillage

- Compteur à scintillation liquide
- Appareillage d'oxydation pour la combustion des produits radioactifs
- Bain à ultrasons de 500 ml
- Verrerie : Erlenmeyers de 250 ml reliés à des tubes à fond rond de 50 ml (récipients biomètres, voir figure 1) ; seringues de 25 ml (par exemple Luer-Lock) ; aiguilles de seringue de jauge 15, de 15 cm de longueur ; seringues de 100 μ l (par exemple Hamilton) ; éprouvettes graduées de 25 ml avec bouchon ; pipettes de 1 ml ; appareil pour extraction au soxhlet ; fioles à scintillation ; tampons de polyuréthane de 30 mm de diamètre, de 30 mm de longueur, de densité 16 kg/m³.

Réactifs

Substance d'épreuve : Les composés marqués au ¹⁴C sont dissous dans de l'eau ou de l'acétone afin d'obtenir une radioactivité de 37 à 185 kBq (\cong 1 à 5 μ Ci/100 μ l). En utilisant du produit non marqué, on ajuste cette solution à la concentration demandée (par exemple 0,5 mg/100 μ l \cong 10 mg/kg de sol, ou selon la toxicité de la substance).

Produits chimiques

KOH, de pureté analytique, solution 0,1 N
Acétone, de pureté analytique

« Biodégradabilité Intrinsèque dans le Sol »

Méthanol, de pureté analytique (pour les essais facultatifs)

n-hexane, de pureté analytique (pour l'essai facultatif)

Ascarite*

Mélange de scintillation

Sol

Alfisol : pH entre 5,5 et 6,5
teneur en carbone organique entre 1 et 1,5 pour cent
teneur en argile (c'est-à-dire particules < 0,002 mm de diamètre) entre 10 et 20 pour cent
capacité d'échange de cations \leq 10 mval

Spodosol : pH entre 4,0 et 5,0
teneur en carbone organique entre 1,5 et 3,5 pour cent
teneur en argile 10 pour cent
capacité d'échange de cations > 10 mval

Entisol : pH entre 6,6 et 8,0
teneur en carbone organique entre 1 et 4 pour cent
teneur en argile entre 11 et 25 pour cent
capacité d'échange de cations < 10 mval

Dans les cas spéciaux, il est recommandé d'utiliser deux sols supplémentaires l'un avec une teneur élevée en fraction vaseuse**, l'autre avec un fort pourcentage en argile (30 pour cent).

Le sol d'essai, séché à l'air et stocké à + 4°C est réhumidifié à 40 pour cent de sa capacité maximale en eau. Après incubation pendant 2 semaines, à 22°C \pm 2°C, dans le noir, le sol est prêt pour les expériences.

• Conditions expérimentales

Température : Durant toute la période d'essai, les flacons sont incubés dans le noir à 22°C \pm 2°C.

Données de caractérisation du sol : Pour déterminer le pH du sol, afin de choisir le type de sol, 10 g de sol séchés à l'air sont mis en suspension dans 25 ml de CaCl₂ 0,01 M. Après avoir

* A.H. Thomas Co. Philadelphie ou équivalent.

** Diamètre entre 0,002 et 0,063 mm.

laissé reposer l'échantillon pendant une nuit, celui-ci est brassé encore une fois et il est mesuré dans un appareil potentiométrique avec une électrode à KCl 0,1 M. Immédiatement avant la mesure, l'instrument doit être calibré avec deux solutions standard, à l'intérieur du domaine de variation attendu pour la mesure des valeurs de l'échantillon.

Pour déterminer la teneur en carbone organique du sol, afin de choisir le type de sol, on chauffe 1,0 g de sol séché à l'air avec 15 ml de $K_2Cr_2O_7$ 2M et 20 ml de H_2SO_4 (pureté analytique $\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$) à 145-155°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à la température ambiante, le volume de l'échantillon est ajusté à 150 ml en ajoutant de l'eau distillée. Après centrifugation, un aliquot de 20 ml est passé au spectrophotomètre à 590 nm dans une cuve de 1 cm et comparé à de l'eau distillée. Le pouvoir auto-destructeur du mélange sulfochromique doit être déterminé par deux échantillons de blancs. Les calculs sont effectués en utilisant l'équation suivante :

$$C = \frac{1000 \cdot V \cdot E_2 (E_x - \alpha_2 \cdot c)}{e \cdot E_1 \cdot (\alpha_1 - \alpha_2 \cdot F)}$$

où

- C = teneur en carbone (%)
- V = volume grossier (ml)
- E_1 = poids équivalent du Cr_2O_3 (25,332)
- E_2 = poids équivalent du carbone (3,0028)
- E_x = extinction à 590 nm et pour une épaisseur de 1 cm
- F = facteur permettant de calculer $K_2Cr_2O_7$ à partir de Cr_2O_3
- c = concentration en Cr (g) dans 100 ml (= 1,9356)
- e = poids d'échantillon (mg)
- α_1 = coefficient d'extinction de Cr (III), α_1 est une valeur moyenne obtenue à partir de cinq déterminations différentes pour la courbe d'étalonnage, chacune étant obtenue par division de E_x par les quantités de Cr_2O_3 (en g)
- α_2 = coefficient d'extinction de Cr (VI), α_2 est une valeur moyenne obtenue à partir de deux estimations différentes, chacune obtenue par division de E_x par les quantités respectives de $K_2Cr_2O_7$.

Pour la détermination de la taille des particules du sol, pour choisir le type de sol, on fait réagir 10,0 g de sol séché à l'air, avec 100 ml de H_2O_2 (à 15 pour cent en poids/volume) pendant 15 heures, puis on chauffe jusqu'à ce que le dégagement de CO_2 soit terminé. Après quoi on laisse

reposer la suspension pendant la nuit avec 25 ml de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,4 N, puis on rajoute de l'eau pour ajuster le volume à 250 ml et la solution est passée à travers un tamis dont les pores font 0,2 mm. La partie $> 0,2$ mm est ensuite fractionnée par tamisage. Les plus petites particules (fractions vaseuses) sont fractionnées par partage homogène des particules en milieu aqueux ajusté à 1000 ml avec de l'eau dans une éprouvette de décantation.

On prélève à la pipette des portions de 10 ml à différentes hauteurs du cylindre, après des temps de sédimentation différents ; la mesure des poids secs du produit en suspension dans ces différentes portions donne la composition en particules selon le schéma suivant :

Diamètre (en mm) des particules de la fraction	profondeur de puisage (en cm)			
	20	15	10	5
< 0,002	-	-	7h 45mn	3h 52mn
< 0,0063	1h 33mn 49s	1h 10mn 52s	46mn 55s	23mn 27s
< 0,02	9mn 19s	6mn 59s	4mn 39s	2mn 20s
< 0,063	59s	42s	-	-

Pour la détermination de la capacité d'échange de cations du sol, afin de choisir le type de sol, on utilise une colonne de verre de 15 cm de longueur et de 30 mm de diamètre intérieur, dont la section est réduite à une extrémité à la façon d'un entonnoir. Ce côté est bouché avec de la laine de verre. Cette laine est recouverte d'environ 1 cm de sable de quartz, puis de 10,0 g de sol d'essai séché à l'air, qui est à son tour recouvert d'environ 1 cm de sable de quartz. Au-dessus de ces couches on dépose 40 ml d'un mélange de solutions (100 g de triéthanolamine dans 21 d'eau, ajusté à pH 8,1 avec de l'HCl, plus 100 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 2 litres d'eau). Au bout d'une heure, la solution est collectée dans un erlenmeyer de 250 ml. Puis on répète l'opération. De plus on verse dans la colonne 40 ml d'une solution constituée par 25 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre.

Après l'avoir laissée incuber toute la nuit, cette solution est également collectée et la colonne est lavée avec 100 ml d'eau. Les éluats rassemblés sont titrés avec de l'HCl (avec du vert de bromocrésol plus du rouge de méthyle comme indicateurs) afin de doser H^+ , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ . Pour la détermination de Ba^{2+} , la colonne est lavée de la même façon avec 200 ml d'une solution de 20 g de $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre d'eau. Ce cation est dosé par spectrophotométrie

de flamme. La capacité d'échange de cations est exprimée par la somme de tous les équivalents cations absorbés par 100 g de sol.

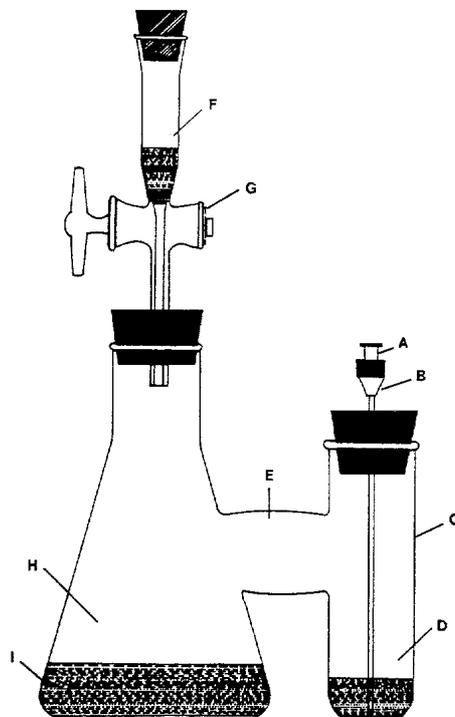
- Exécution de l'essai

Essai de base

Cinquante grammes de sol (équivalent en poids sec) sont placés dans la partie erlenmeyer (H) de chacun des biomètres (voir figure 1). 50 gouttes de la solution d'essai radioactive correspondant à 100 μ l sont ajoutées sur toute la surface du sol (I) de chacun des flacons. Le sol est ensuite soigneusement mélangé avec un pipette Pasteur (dont l'extrémité inférieure a été cassée) qu'on laisse dans le flacon.

De surcroît, on place un volume équivalent de la solution d'essai dans un récipient jaugé de 100 ml pour mesurer directement la radioactivité ajoutée.

Figure 1 : Flacon d'essai



« Biodégradabilité Intrinsèque dans le Sol »

Le récipient du biomètre est fermé avec un bouchon de caoutchouc siliconé recouvert de téflon dans lequel est inséré un filtre Ascarite (F). Ce filtre (F) est muni d'un bouchon et d'un robinet d'arrêt (G). Le tube latéral est fermé d'un bouchon en téflon percé d'une aiguille de jauge 15 (B), de 15 cm de long. L'aiguille (B) est surmontée d'un bouchon en caoutchouc siliconé (A), et son extrémité en D est recouverte d'une petite longueur de tube en silicone, qui reste en contact avec le fond du tube latéral (C).

L'appareil est chargé en injectant 10 ml de potasse dans le tube latéral, de façon suivante : le petit bouchon (A) est remplacé par une seringue Luer Lock étalonnée, contenant du KOH 0,1 N ; puis on enlève le bouchon filtre de (F) et le robinet (G) est ouvert ; la solution de potasse est introduite à travers l'aiguille (B) dans le tube latéral (C) ; puis on ferme le robinet ; la seringue est enlevée ; on remet alors le petit bouchon (A) et le bouchon filtre sur (F) dans leurs positions initiales. Le dioxyde de carbone produit, marqué au ^{14}C , est adsorbé par la base.

Pour récupérer la potasse chargée en $^{14}\text{CO}_2$, en vue d'une analyse par scintillation liquide, on répète dans l'ordre inverse le processus utilisé pour charger chaque unité parallèle à des intervalles de temps croissants après le début de l'expérience. Par la suite, le tube latéral (C) est rincé avec 5 ml de potasse. Avant de recharger le tube latéral (C) de potasse fraîche on fait passer 3 fois 25 ml d'air à travers le système grâce à la seringue vide, afin de maintenir le sol dans des conditions aérobies. Pour le comptage en scintillation liquide, on prend un aliquot de 1 ml de solution de potasse. Pour la mesure, on doit choisir des durées d'expérience de 1, 2, 4, 8, 16, 32 et, si nécessaire, 64 jours. L'essai nécessite des déterminations en parallèle. On porte sur une courbe la radioactivité due au $^{14}\text{CO}_2$ récupéré, en fonction du temps. Ce graphique indique à quel moment on peut terminer l'expérience. Le temps d'incubation est considéré comme suffisant, quand on peut mesurer un total de 50 pour cent du CO_2 formé à partir du ^{14}C introduit au départ. Au bout de 64 jours, l'incubation doit être arrêtée, que l'on ait atteint ou non cette valeur.

Essais facultatifs***Estimation de l'évaporation***

Si la volatilité d'un produit chimique est supérieure à 10^{-5} torr à 20°C, il est recommandé d'introduire un tampon en mousse de polyuréthane de 3 cm de diamètre dans le bras E du biomètre. Ce tampon absorbe le composé de départ volatil, ainsi que les produits de dégradation

organiques volatils, mais il n'absorbe pas le $^{14}\text{CO}_2$. Les tampons sont extraits dans un appareil d'extraction de soxhlet avec un mélange n-hexane/méthanol (1/4) et des aliquots sont prélevés pour le comptage par scintillation liquide.

Détermination des résidus du sol extractibles et non-extractibles

Dans le cas de produits chimiques relativement persistants (50 pour cent de minéralisation en > 10 jours), il est recommandé de se procurer de plus amples informations sur la radioactivité extractible du sol (composé de départ plus produits de dégradation) et sur les résidus liés au sol.

Dans ce but, on doit préparer deux autres biomètres en plus des quatre autres. Au moment où il y a 50 (ou x) pour cent de minéralisation dans l'essai de base, le sol des deux biomètres différents est extrait avec 100 ml d'acétone (traitement de 5 mn aux ultrasons) puis de la même façon avec du méthanol. Des aliquots de ces extraits réunis sont prélevés en vue de leur comptage en scintillation liquide. On peut utiliser d'autres fractions de l'extrait, si nécessaire, pour des études d'identification plus poussées.

Des aliquots du sol séché à l'air sont brûlés de telle façon qu'ils soient oxydés en $^{14}\text{CO}_2$, puis par comptage en scintillation liquide on détermine les résidus liés au sol.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

• Calcul des résultats

Essai de base

Les valeurs de la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ (moyenne de 4 expériences parallèles) obtenues dans la solution de potasse au bout de 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64 jours sont exprimées sous forme de pourcentage du produit chimique radioactif initialement introduit et elles sont portées sur une courbe en fonction du temps. Le temps au bout duquel on récupère 50 pour cent de la radioactivité sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ est considéré comme étant le niveau de « 50% de minéralisation ». Si ce niveau n'a pas été atteint au bout de 64 jours, on prend les données obtenues à ce moment et on les appelle « x pour cent de minéralisation ».

Essai d'évaporation

La radioactivité du composé original plus celle des produits de dégradation vaporisés (et récupérés) au point de 50 (ou x) pour cent de minéralisation est extraite, mesurée et interprétée comme étant le pourcentage de volatilisation au point de 50 (ou x) pour cent de minéralisation.

Essai de résidu

On donne les valeurs de la radioactivité des résidus extractibles et non extractibles du composé de départ et des produits de dégradation obtenus après la manipulation d'extraction du sol au point de 50 (ou x) pour cent de minéralisation.

• R a p p o r t

Le rapport sur la dégradabilité d'un produit chimique doit inclure :

- le nom du produit chimique à tester, sa formule
- la quantité mise en jeu, si celle-ci ne correspond pas à la norme
- les données caractéristiques exactes du sol utilisé
- les dates du déroulement des mesures.

• I n t e r p r é t a t i o n e t é v a l u a t i o n d e s r é s u l t a t s

Les résultats sont artificiels car ils ont été obtenus avec des sols brassés. Cependant, puisqu'on utilise des sols normalisés, on peut comparer les résultats entre eux et ceci permet à l'expérimentateur de classer sur une même échelle les produits chimiques étudiés pour cette propriété.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. Bartha, R. et Pramer D., *Soil Science* 100, 68-70 (1965).
2. *Soil Taxonomy* (Equipe de surveillance du sol) Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis, Handbook n° 436, Washington, D. C., 1975.
3. Butler, B.E. *Soil classification for Soil Survey*, Oxford, 129 p, 1980.