

## PARTIE C: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ÉCOTOXICITÉ

### INTRODUCTION GÉNÉRALE: PARTIE C

Les méthodes d'essai décrites ci-après sont utilisées pour la détermination de certaines propriétés écotoxicologiques énumérées à l'annexe VIII de la directive 79/831/CEE. Les déclarants doivent savoir que les méthodes de détermination des propriétés suivantes prévues au niveau 1 de l'annexe VIII ne sont pas incluses dans le texte:

- étude de toxicité prolongée avec *Daphnia magna*,
- essai sur une plante supérieure,
- étude de toxicité prolongée avec un poisson

Lorsque des méthodes d'essai pour la détermination de ces propriétés auront été mises au point, elles seront publiées sous forme de nouvelle adaptation au progrès technique. Dans l'intervalle, les notifiants doivent utiliser des méthodes adéquates et reconnues à l'échelon international qui auront été communiquées à l'autorité compétente.

## C. 8

### TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE

#### ESSAI SUR SOL ARTIFICIEL

#### 1. MÉTHODE

##### 1.1. Introduction

Dans cet essai de laboratoire, la substance d'essai est ajoutée à un sol artificiel dans lequel les vers sont placés pendant 14 jours. Au bout de cette période (et facultativement au bout de 7 jours), l'effet létal de la substance sur les vers de terre est examiné. La méthode permet de déterminer assez rapidement l'effet de l'absorption dermique et de l'ingestion des produits chimiques sur les vers de terre.

##### 1.2. Définition et unité

CL<sub>50</sub>: concentration d'une substance considérée comme responsable de la mort de 50 % des animaux d'expérience pendant la durée de l'essai.

##### 1.3. Substance de référence

Une substance de référence est utilisée périodiquement pour démontrer que la sensibilité du système n'a pas changé de façon significative.

La substance de référence recommandée est le chloracétamide de qualité analytique.

##### 1.4. Principe de l'essai

Le sol étant un milieu variable, on utilise pour cet essai un sol limoneux artificiel soigneusement défini. Des vers de terre adultes de l'espèce *Eisenia foetida* (voir note en appendice) sont placés dans un sol artificiel défini, traité par différentes concentrations de la substance d'essai. Le contenu des récipients est étalé sur un plateau 14 jours (et facultativement 7 jours) après le début de l'essai et, pour chaque concentration, les vers de terre survivants sont comptés.

##### 1.5. Critères de qualité

L'essai est conçu pour être aussi reproductible que possible au point de vue du substrat et de l'organisme. Si la mortalité des témoins dépasse 10 % à la fin de l'essai, celui-ci n'est pas valide.

##### 1.6. Description de la méthode d'essai

###### 1.6.1. Matériel

###### 1.6.1.1. Substrat

On utilise comme substrat de base un sol artificiel bien défini.

a) Substrat de base (les pourcentages sont exprimés en poids sec):

- 10 % de tourbe à sphaignes (de pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0, ne contenant pas de restes de plante visibles et finement broyée),
- 20 % d'argile kaolinique contenant si possible plus de 50 % de kaolinite,
- environ 69 % de sable quartzique industriel (essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules de granulométrie comprise entre 0,05 et 0,2 mm). Si la substance n'est pas suffisamment dispersible dans l'eau, 10 g par récipient doivent être mis de côté pour être mélangés ultérieurement à la substance à tester,
- environ 1 % de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) pulvérisé, chimiquement pur, pour ajuster le pH à 6,0 ± 0,5.

b) Substrat d'essai:

Le substrat pour les essais contient le substrat de base, la substance d'essai et de l'eau désionisée.

Le teneur en eau est d'environ 25 à 42 % du poids sec du substrat de base. La teneur en eau du substrat est déterminée par séchage d'un échantillon à 105 °C, jusqu'à ce que le poids reste constant. Le critère clé est que le sol artificiel doit être humidifié jusqu'à saturation. Le mélange doit être effectué soigneusement, de manière à obtenir une répartition uniforme de la substance d'essai et du substrat. La façon dont la substance d'essai est introduite dans le substrat doit être indiquée.

c) Substrat témoin:

Le substrat témoin contient le substrat de base et de l'eau. Si l'on utilise un additif, un substrat témoin supplémentaire doit contenir la même quantité d'additif.

1.6.1.2. **Réceptifs**

Réceptifs en verre d'une capacité d'environ 1 litre (convenablement recouverts de couvercles en plastique, de coupelles ou d'une feuille de plastique avec trous d'aération), remplis d'une quantité de substrat d'essai ou de substrat témoin humide équivalant à 500 g de substrat sec.

1.6.2. **Conditions expérimentales**

Les réceptifs doivent être déposés dans des locaux climatisés dont la température est maintenue à  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , sous éclairage continu compris entre 400 et 800 lux.

La durée de l'essai est de 14 jours, mais la mortalité peut être déterminée 7 jours après le début de l'essai.

1.6.3. **Méthode**

**Concentrations**

Les concentrations de la substance d'essai sont exprimées en poids de substance par unité de substrat de base sec (mg/kg).

**Essai de sélection des concentrations à utiliser**

La gamme des concentrations correspondant à des taux de mortalité allant de 0 à 100 % peut être déterminée par un essai renseignant sur l'intervalle de concentrations à utiliser dans l'essai définitif.

La substance doit être testée aux concentrations suivantes: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de substance/kg de substrat (poids sec).

Si un essai définitif complet est effectué, un lot par concentration et un lot témoin contenant chacun dix vers devraient être suffisants pour l'essai de sélection des concentrations à utiliser.

**Essai définitif**

Les résultats de l'essai de sélection des concentrations à employer sont utilisés pour choisir au moins 5 concentrations dans une série géométrique couvrant exactement l'intervalle de 0 à 100 % de mortalité et dans un rapport constant inférieur ou égal à 1,8.

Un essai utilisant cette série de concentrations devrait permettre d'évaluer avec la plus grande précision possible la valeur de la  $CL_{50}$  et de ses limites de confiance.

Pour l'essai définitif, on utilise au moins 4 lots par concentration et 4 lots témoins contenant chacun 10 vers. Les résultats de ces lots en parallèle sont exprimés sous la forme de moyenne et d'écart type.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 % et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la  $CL_{50}$ .

**Mélange du substrat de base et de la substance d'essai**

Le substrat ne devrait pas, si possible, contenir d'autres additifs que de l'eau. Immédiatement avant le début de l'essai, une émulsion ou une dispersion de la substance d'essai dans de l'eau désionisée ou dans un autre solvant est mélangée au substrat de base ou uniformément projetée à sa surface à l'aide d'un pulvérisateur de chromatographie ou du même type.

Si elle est insoluble dans l'eau, la substance d'essai peut être dissoute dans le plus petit volume possible d'un solvant organique approprié (par exemple hexane, acétone ou chloroforme).

Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. Avant emploi, le substrat doit être aéré. La quantité d'eau évaporée doit être remplacée. Le substrat témoin doit contenir la même quantité de tout additif.

Si la substance d'essai n'est pas soluble, dispersible ou émulsifiable dans des solvants organiques, 10 g d'un mélange de sable quartzique finement broyé et d'une quantité de substance d'essai correspondant à la dose nécessaire pour traiter 500 g de sol artificiel sec sont mélangés à 490 g de substance d'essai sèche.

Pour chaque lot, une quantité de substrat humide équivalant à 500 g de poids sec est placée dans chaque réceptif en verre et 10 vers de terre ayant été conditionnés pendant 24 heures dans un substrat de base humide analogue, puis rincés rapidement, l'eau excédentaire étant absorbée sur un papier-filtre sont placés à la surface du substrat.

Les réceptifs sont recouverts de couvercles, de coupelles ou d'une feuille en plastique perforé afin d'éviter le dessèchement du substrat et ils sont maintenus dans les conditions d'essai pendant 14 jours.

Les évaluations doivent être faites au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours). Le substrat est étalé sur une plaque de verre ou d'acier inoxydable. Les vers de terre sont examinés et le nombre de vers de terre survivants est déterminé. Les vers de terre sont considérés comme morts s'ils ne réagissent pas à un léger stimulus mécanique appliqué à leur extrémité antérieure.

Lorsque l'examen est fait au bout de 7 jours, le réceptif est à nouveau rempli de substrat et les vers de terre survivants sont replacés sur le même substrat.

1.6.4. *Organismes d'expérience*

Les organismes d'expérience doivent être des *Eisenia foetida* adultes (voir note en appendice) (âgés d'au moins 2 mois, avec clitellum) — poids humide: 300 à 600 mg (pour la méthode d'élevage, voir appendice).

2. **RÉSULTATS**

2.1. **Traitement et évaluation des résultats**

Les concentrations de la substance d'essai sont consignées avec les pourcentages correspondants de vers de terre morts.

Si les données sont adéquates, la valeur de la  $CL_{50}$  et les intervalles de confiance ( $p = 0,05$ ) sont déterminées à l'aide de méthodes standards (Litchfield et Wilcoxon, 1949 ou méthode équivalente). La  $CL_{50}$  doit être exprimée en milligrammes de la substance d'essai par kilogramme de substrat (poids sec).

Dans le cas où la pente de la courbe est trop accentuée pour permettre le calcul de la  $CL_{50}$ , il suffira de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 ou 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la  $CL_{50}$ .

3. **PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

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

- attestation de conformité de l'essai aux critères de qualité énoncés ci-dessus,
- essai effectué (essai de détermination des ordres de grandeur et/ou essai définitif),
- description précise des conditions d'essai ou attestation de conformité de l'essai, tout écart par rapport à la méthode étant indiqué,
- description précise de la manière dont la substance d'essai a été mélangée au substrat de base,
- information sur les organismes soumis à l'essai (espèce, âge, poids moyen et gamme de poids, conditions d'élevage, fournisseur),
- méthode appliquée pour déterminer la  $CL_{50}$ ,
- résultat de l'essai, avec toutes les données utilisées,
- description des symptômes observés ou des modifications du comportement des organismes soumis à l'essai,
- mortalité chez les témoins,
- $CL_{50}$  ou concentration maximale testée n'ayant pas causé de mortalité et concentration minimale testée ayant causé 100 % de mortalité au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours),
- tracé de la courbe concentrations/réponses,
- résultats obtenus avec la substance de référence, au cours du présent essai ou de contrôles antérieurs de la qualité.

4. **RÉFÉRENCES**

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 207*, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pages.
- (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut national de la recherche agronomique, 671 pages.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., *A simplified method of evaluating dose-effect experiments*, J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, pages 99.
- (5) Commission des Communautés européennes, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden»*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

## Appendice

### Élevage des vers avant les essais

30 à 50 vers adultes sont introduits dans un récipient d'élevage contenant du substrat frais et en sont retirés au bout de 14 jours. Ces animaux peuvent être utilisés pour de nouveaux lots d'élevage. Les vers de terre sortis des cocons sont utilisés pour les essais lorsqu'ils sont arrivés à maturité (soit au bout de deux ou trois mois dans les conditions prescrites).

### Conditions d'élevage

Local climatisé: température:  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , de préférence sous éclairage continu (intensité 400 à 800 lux).

Récipient d'élevage: récipients creux d'une capacité de 10 à 20 litres.

Substrat: l'*Eisenia foetida* peut être élevé avec différents excréments animaux. Il est recommandé d'utiliser comme milieu d'élevage un mélange en volume de 50% de fumier de vache ou de cheval et de 50% de tourbe. Le milieu doit avoir un pH d'environ 6 ou 7 (ajusté avec du carbonate de calcium) et une faible conductivité ionique (moins de 6 mmhos ou une concentration de sel de 0,5%). Le substrat doit être humide, mais ne doit pas être trop mouillé.

Outre la méthode décrite ci-dessus, d'autres méthodes peuvent être utilisées.

*Note:* Il existe deux races d'*Eisenia foetida* que certains taxonomistes ont séparées en espèces (Bouche, 1972). Celles-ci sont morphologiquement semblables, mais l'une, *Eisenia foetida foetida*, se distingue par des rayures ou des bandes sur les segments, tandis que l'autre, *Eisenia foetida andrei*, n'en a pas et a une couleur rougeâtre aux nuances variées. Il convient d'utiliser si possible *Eisenia foetida andrei*. D'autres espèces peuvent être utilisées si l'on dispose de la méthodologie nécessaire.

## C. 9

### BIODÉGRADATION

#### ESSAI DE ZAHN ET WELLENS

#### 1. MÉTHODE

##### 1.1. Introduction

La présente méthode a pour but d'évaluer la biodégradabilité totale potentielle de substances organiques non volatiles solubles dans l'eau lorsqu'elles sont exposées à des concentrations relativement élevées de micro-organismes lors d'un essai statique.

Il peut y avoir adsorption physico-chimique sur les solides en suspension, et il convient d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Les substances à étudier sont utilisées dans des concentrations correspondant à des valeurs de COD allant de 50 à 400 mg/litre ou à des valeurs de DCO situées entre 100 et 1 000 mg/litre (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène). Ces concentrations relativement élevées assurent une bonne fiabilité analytique. Les composés possédant des propriétés toxiques peuvent ralentir ou empêcher le processus de dégradation.

Dans cette méthode, on emploie la mesure de la concentration du carbone organique dissous ou la demande chimique en oxygène pour évaluer la biodégradation finale de la substance d'essai.

L'emploi simultané d'une méthode analytique spécifique peut permettre d'évaluer la biodégradation primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration utilisée dans l'essai:

- sont solubles dans l'eau dans les conditions de l'essai,
- ont une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai,
- n'ont pas d'effets inhibiteurs vis-à-vis des bactéries,
- ne font pas l'objet d'une adsorption importante sur l'appareillage,
- ne disparaissent pas de la solution par formation de mousse.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

La connaissance de la toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes peut être intéressante pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

##### 1.2. Définitions et unités

Le taux de dégradation obtenu à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité en essai de Zahn et Wellens»:

$$D_T (\%) = \left[ 1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

dans laquelle:

$D_T$  = biodégradation (%) au temps T,

$C_A$  = valeurs du COD (ou de la DCO) du mélange d'essai mesurées 3 heures après le début de l'essai (mg/l)  
(COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène),

$C_T$  = valeurs du COD ou de la DCO du mélange d'essai au moment du prélèvement de l'échantillon (mg/l),

$C_B$  = valeur du COD ou de la DCO du témoin au moment du prélèvement (mg/l),

$C_{BA}$  = valeur du COD ou de la DCO du témoin mesurée 3 heures après le début de l'essai (mg/l).

Le taux de dégradation obtenu est arrondi au pourcentage entier le plus proche.

Le pourcentage de dégradation est défini comme étant le pourcentage de disparition du COD (ou de la DCO) de la substance d'essai.

La différence entre la valeur mesurée après 3 heures et la valeur initiale calculée ou, mieux, mesurée, peut donner des renseignements intéressants sur l'élimination de la substance (voir 3.2: Interprétation des résultats).

1.3. **Substances de référence**

Des substances de référence peuvent parfois être utiles lors de l'étude de substances nouvelles; toutefois, des substances de référence spécifiques ne peuvent pas encore être recommandées.

1.4. **Principe de la méthode d'essai**

On introduit la boue activée, les substances nutritives minérales et une solution aqueuse de la substance à examiner constituant la seule source de carbone dans un récipient en verre de 1 à 4 litres muni d'un agitateur et d'un aérateur.

Le mélange est agité et aéré à une température de 20 à 25 °C, en lumière diffuse ou en chambre noire pendant une période pouvant aller jusqu'à 28 jours. Le processus de dégradation est suivi en déterminant la valeur du COD (ou de la DCO) dans la solution filtrée, quotidiennement ou selon une autre périodicité appropriée. Après chaque période, le COD (ou la DCO) éliminé est rapporté à la valeur constatée 3 heures après le début de l'essai et exprimé en pourcentage de biodégradation; cela constitue la mesure du taux de dégradation à ce moment. Le résultat rapporté graphiquement en fonction du temps donne la courbe de biodégradation.

Si on utilise une méthode analytique spécifique, on peut mesurer les variations de la concentration de la molécule originale dues à la biodégradation (biodégradabilité primaire).

1.5. **Critères de qualité**

La reproductibilité de la méthode a été reconnue satisfaisante lors d'un essai d'intercomparaison.

La sensibilité de la méthode est largement déterminée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination du carbone organique dissous et de la concentration de la substance dans le milieu d'essai.

1.6. **Description**

1.6.1. **Préparations**

1.6.1.1. **Réactifs**

Eau: eau potable contenant moins de 5 mg/l de carbone organique. La concentration totale d'ions calcium et magnésium ne doit pas dépasser 2,7 mmoles/l; si ce n'est pas le cas, corriger la dilution par addition d'eau déionisée ou distillée.

Acide sulfurique, pureté analytique (P.A.): 50 g/l.

Solution d'hydroxyde de soude P.A.: 40 g/l.

Solution nutritive minérale: dissoudre dans un litre d'eau déionisée:

Chlorure d'ammonium, NH<sub>4</sub>Cl, P.A.: 38,40 g,

Dihydrogénophosphate de sodium, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, P.A.: 33,40 g,

Dihydrogénophosphate de potassium, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, P.A.: 8,50 g,

Monohydrogénophosphate de potassium, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, P.A.: 21,75 g.

Le mélange sert à la fois de milieu nutritif et de solution tampon.

1.6.1.2. **Appareillage**

Récipients en verre contenant entre 1 et 4 litres (par exemple récipients cylindriques).

Dispositif d'agitation comprenant un agitateur en verre ou en métal fixé à une tige appropriées (l'agitateur doit décrire un mouvement rotatif à environ 5 à 10 cm au-dessus du fond du récipient). On peut utiliser également un agitateur magnétique muni d'un barreau de 7 à 10 cm de long.

Tube d'aération en verre de 2 à 4 mm de diamètre intérieur. L'ouverture du tube doit se trouver à environ 1 cm au-dessus du fond du récipient.

Centrifugeuse (environ 3 550 g).

pH-mètre.

Appareil pour la mesure de l'oxygène dissous.

Filtres papier.

Appareil de filtration sur membranes.

Membranes filtrantes, porosité: 0,45 µm. Les membranes filtrantes conviennent si elles ne libèrent pas de carbone et n'absorbent pas la substance au stade de la filtration.

Matériel d'analyse pour le dosage du carbone organique et la détermination de la demande chimique en oxygène.

#### 1.6.1.3. Préparation de l'inoculum

Laver la boue activée provenant d'une station d'épuration biologique par centrifugations ou décantations successives dans l'eau utilisée pour l'essai (voir *supra*).

La boue activée doit avoir les caractéristiques requises. Cette boue peut être obtenue dans une station d'épuration en bon état de fonctionnement.

Pour disposer d'autant d'espèces et de souches différentes de bactéries que possible, il peut être préférable de mélanger des inoculums provenant de sources différentes (par exemple de différentes stations d'épuration, d'extrait de sol, des eaux de rivière, etc.). Le mélange doit être traité comme indiqué plus haut.

Pour le contrôle d'activité de la boue activée, voir *infra* «Contrôle fonctionnel».

#### 1.6.1.4. Préparation des solutions

Dans le récipient d'essai, ajouter 500 ml d'eau (voir *supra*), 2,5 ml/litre de solution minérale nutritive et une quantité de boues activées correspondant à 0,2 – 1,0 g/l de matière sèche dans le mélange final. Ajouter suffisamment de solution stock de la substance à tester de façon à obtenir dans le mélange final une concentration de COD de 50 à 400 mg/l. Les valeurs correspondantes de DCO sont 100 – 1 000 mg/l. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume total de 1 à 4 litres. Le volume total choisi dépend du nombre d'échantillons à prélever pour la détermination du COD ou de la DCO et du volume nécessaire pour l'analyse.

Normalement, on considère 2 litres comme un volume satisfaisant.

Pour chaque série d'essais, préparer au moins un récipient témoin (blanc) contenant uniquement de la boue activée et la solution minérale nutritive, diluées avec de l'eau jusqu'au même volume total que dans les récipients d'essai.

#### 1.6.2. Mode opératoire

Les récipients d'essai sont agités au moyen d'agitateurs magnétiques ou à hélice, en lumière diffuse ou en chambre noire, à une température de 20 à 25 °C. L'aération est assurée par injection d'air comprimé purifié par un filtre d'ouate et si nécessaire par un flacon laveur. Veiller à ce que la boue ne décante pas et que la concentration d'oxygène ne tombe pas au-dessous de 2 mg/l. Vérifier le pH à intervalles réguliers (par exemple quotidiennement) et l'amener le cas échéant à pH 7 – 8.

Les pertes dues à l'évaporation sont compensées juste avant chaque prélèvement d'échantillon au moyen d'eau déionisée ou distillée. Une bonne méthode consiste à marquer le niveau du liquide sur le récipient avant de commencer l'essai. De nouvelles marques sont faites après chaque prélèvement (sans aération ni agitation). Les premiers échantillons sont toujours prélevés 3 heures après le début de l'essai de façon à permettre de détecter une adsorption de la substance d'essai sur la boue activée.

Pour suivre la dégradation de la substance d'essai, effectuer un dosage de COD ou de DCO quotidiennement ou à tout autre intervalle régulier. Filtrer les échantillons provenant du récipient d'essai et du récipient témoin sur un papier filtre soigneusement lavé. Éliminer les 5 premiers millilitres du filtrat de la solution d'essai. Les boues difficilement filtrables peuvent être éliminées au préalable par une centrifugation de 10 minutes. Les déterminations de COD et de DCO sont faites au moins en double. La durée des essais va jusqu'à 28 jours.

*Note:* Les échantillons restant troubles sont filtrés sur membranes. Celles-ci ne doivent ni libérer ni adsorber de matières organiques.

#### Contrôle fonctionnel des boues activées

Pour chaque série d'essais, on peut prévoir un récipient contenant une substance connue, de façon à pouvoir vérifier la capacité fonctionnelle de la boue activée. Le diéthylène glycol s'est révélé utile à cette fin.

#### Adaptation

Si des analyses sont effectuées à des intervalles relativement courts (par exemple quotidiennement), la courbe de dégradation peut faire clairement apparaître un phénomène d'adaptation (voir figure 2). L'essai ne devrait donc pas être commencé immédiatement avant un week-end.

Si l'adaptation se produit dans les derniers jours de l'essai, celui-ci peut être prolongé jusqu'à dégradation complète.

*Note:* Si une meilleure connaissance du comportement de la boue adaptée est nécessaire, on exposera à nouveau la même boue activée à la même substance d'essai suivant le mode opératoire ci-après:

Arrêter l'agitateur et l'aérateur et laisser décanter la boue activée. Éliminer le surnageant, remplir d'eau jusqu'à atteindre 2 litres, agiter pendant 15 minutes et laisser à nouveau décanter. Éliminer à nouveau le surnageant, et utiliser la boue restante pour répéter l'essai avec la même substance conformément aux paragraphes 1.6.1.4 et 1.6.2 ci-dessus.

La boue activée peut également être séparée par centrifugation plutôt que par décantation.

La boue adaptée peut être mélangée avec de la boue fraîche pour atteindre 0,2 à 1 g de matière sèche par litre.



### Analyses

En général, on filtre les échantillons sur papier-filtre soigneusement lavé à l'eau déionisée. Les échantillons qui restent troubles sont filtrés sur membranes (0,45 µm).

Déterminer la concentration de COD en double dans les filtrats des échantillons (éliminer les cinq premiers millilitres), à l'aide d'un appareil de mesure du COT. Si l'analyse du filtrat ne peut être faite le jour même, le conserver au réfrigérateur jusqu'au lendemain. Il est déconseillé de la conserver plus longtemps.

Déterminer la concentration de DCO dans les filtrats d'échantillon à l'aide du dispositif d'analyse de la DCO conformément au mode opératoire décrit dans la référence (2) ci-après.

## 2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Procéder au moins à deux déterminations de la concentration de COD et de DCO dans les échantillons, conformément aux indications fournies ci-dessus au paragraphe 1.6.2. Calculer le pourcentage de dégradation au temps T suivant la formule (avec ses définitions) donnée au paragraphe 1.2 ci-dessus.

Arrondir le taux de dégradation à l'unité de pourcentage la plus proche. Le taux de dégradation atteint à la fin de l'essai constitue la «Biodégradabilité» dans l'essai de Zahn-Wellens».

*Note:* Si la dégradation complète est réalisée avant la fin de la durée de l'essai et si ce résultat est confirmé par une seconde analyse effectuée le lendemain, il peut être mis fin à l'essai.

## 3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

### 3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal de l'essai contiendra, si possible:

- la concentration initiale de la substance,
- toutes autres indications et les résultats expérimentaux relatifs à la substance testée, à la substance de référence éventuelle, et au témoin,
- la concentration après trois heures,
- la courbe de biodégradation avec description,
- la date et l'endroit du prélèvement de l'inoculum, stade d'adaptation, concentration utilisée, etc.,
- les raisons scientifiques d'éventuelles modifications de la procédure d'essai.

### 3.2. Interprétation des résultats

L'élimination du COD (ou de la DCO) qui se produit graduellement pendant un certain nombre de jours ou de semaines indique que la substance testée se dégrade biologiquement.

Cependant, une adsorption physico-chimique peut jouer un rôle dans certains cas: ceci est montré lorsqu'il y a élimination totale ou partielle de la substance dès le début, lors des 3 premières heures, et que la différence entre le surnageant des milieux témoins et d'essai reste faible.

Des essais supplémentaires sont nécessaires si l'on doit faire la distinction entre biodégradation (ou biodégradabilité partielle) et adsorption.

Il y a pour cela plusieurs méthodes, la meilleure étant d'employer le surnageant comme inoculum dans un essai du niveau de base (de préférence un essai respirométrique).

Les substances donnant dans cet essai une élimination élevée, non liée à l'adsorption du COD (ou de la DCO) devraient être considérées comme potentiellement biodégradables. Une élimination partielle, non liée à l'adsorption, indique que le produit chimique est au moins biodégradable dans une certaine mesure. Une élimination faible ou nulle de COD (DCO) peut être due à l'inhibition des micro-organismes par la substance testée; ceci peut être révélé par lyse et perte de boue donnant des surnageants troubles. L'essai devrait être répété avec une concentration plus faible de substance.

L'emploi d'une méthode analytique spécifique ou d'une substance d'essai marquée au  $^{14}\text{C}$  peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas de composés marqués au  $^{14}\text{C}$ , la récupération de  $^{14}\text{CO}_2$  confirmera qu'il y a eu biodégradation.

Quand les résultats sont exprimés en termes de biodégradation primaire, il conviendrait de fournir dans la mesure du possible une explication concernant le changement de structure chimique qui a conduit à une diminution de réponse de la substance d'origine.

La validation de la méthode analytique doit être accompagnée de l'indication de la réponse trouvée avec le témoin.

#### 4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 302 B*, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Annexe V, C. 9. «Dégradation: demande chimique en oxygène», de la directive 84/449/CEE, *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 251 du 19 septembre 1984.

*Appendice*

**EXEMPLE D'ÉVALUATION**

**Composé organique:** acide 4-éthoxybenzoïque  
**Concentration théorique:** 600 mg/l  
**COD théorique:** 390 mg/l

**Inoculum:** Station d'épuration des eaux d'égout de . . .  
**Concentration:** 1 gramme de matière sèche par litre  
**État d'adaptation:** non adapté

**Analyse:** détermination du COD

**Volume de l'échantillon:** 3 ml

**Substance de contrôle:** diéthylèneglycol

**Toxicité du composé:** sans effet toxique au-dessous de 1 000 mg/l  
 Essai pratique: essai des tubes de fermentation.

Temps	Substance de contrôle				Substance à étudier		
	Blanc COD (1) mg/l	COD (1) mg/l	COD net mg/l	Dégradation %	COD (1) mg/l	COD net mg/l	Dégradation %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 heures	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 jour	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 jours	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 jours	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 jours	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 jours	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 jours	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 jours	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 jours	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valeurs moyennes de 3 déterminations.

Figure 1

Exemples de courbes de biodégradation

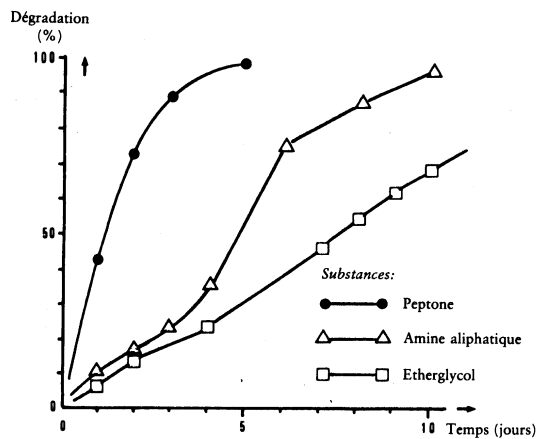
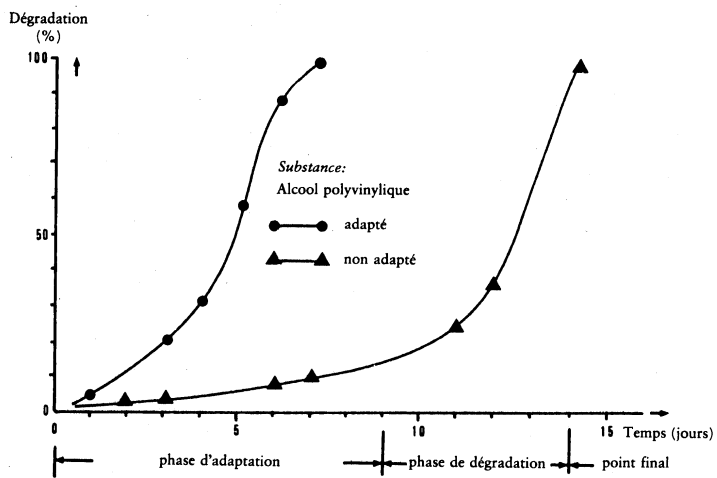


Figure 2

Exemples d'adaptation d'une boue



## C. 10

### BIODÉGRADATION

#### ESSAIS DE SIMULATION DE BOUES ACTIVÉES

#### 1. MÉTHODE

##### 1.1. Introduction

###### 1.1.1. Remarques générales

Cette méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai:

- sont suffisamment solubles dans l'eau pour permettre la préparation des solutions d'essai,
- ont une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai,
- n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

Il est souhaitable de connaître le seuil de toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

###### 1.1.2. Détermination de la biodégradabilité totale (analyse COD/DCO)

Le but de la méthode est de déterminer la biodégradabilité totale en mesurant la disparition de la substance et de tout métabolite de la substance dans une maquette d'installation de traitement de boues activées à une concentration correspondant à > 12 mg de COD/L (ou approximativement 40 mg de DCO/l). 20 mg de COD/l semble un chiffre optimal (COD = carbone organique dissout, DCO = demande chimique en oxygène).

La teneur en carbone organique (ou la demande chimique en oxygène) de la substance d'essai doit être établie.

###### 1.1.3. Détermination de la biodégradabilité primaire (analyse spécifique)

Le but de la méthode est de déterminer la biodégradabilité primaire d'une substance dans une maquette d'installation de traitement de boues activées à une concentration d'environ 20 mg/l, à l'aide d'une méthode d'analyse spécifique (une concentration plus faible ou plus élevée peut être utilisée si la méthode d'analyse et les limites de toxicité le permettent). Cela permet d'évaluer la biodégradabilité primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

Le but de cette méthode n'est pas de déterminer le degré de minéralisation de la substance d'essai.

Une méthode adéquate d'analyse doit être disponible pour la détermination de la substance d'essai.

##### 1.2. Définitions et unités

###### 1.2.1. Analyse COD/DCO

Le taux de dégradation de la substance est donné par la formule

$$TD = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 (a)]$$

où:

TD = taux de dégradation en pourcentage de COD (ou de DCO) pendant le temps de rétention moyen donné de la substance d'essai,

T = concentration de la substance d'essai dans le milieu entrant dans l'unité d'essai en mg de COD/l (ou mg de DCO/l),

E = concentration de COD (ou DCO) dans le milieu sortant de l'unité d'essai en mg de COD/l (ou de DCO/l),

E<sub>0</sub> = concentration de COD (ou DCO) dans le milieu sortant de l'unité témoin en mg de COD/l (ou DCO/l).

La dégradation est exprimée en pourcentage de disparition du COD (ou de la DCO) pendant le temps de rétention donné de la substance d'essai.

### 1.2.2. Analyse spécifique

Le pourcentage d'élimination de la substance d'essai de la phase aqueuse ( $R_W$ ) pendant le temps de rétention moyen donné s'obtient à l'aide de la formule

$$R_W = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100\% \quad [1 (b)]$$

où:

$C_i$  = concentration de la substance dans le milieu entrant dans l'unité d'essai (mg de substance/l, déterminée par l'analyse spécifique),

$C_o$  = concentration de la substance dans le milieu sortant de l'unité d'essai (mg de substance/l, déterminée par l'analyse spécifique).

### 1.3. 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 produits de référence particuliers.

### 1.4. Principe des méthodes d'essai

Pour la détermination de la biodégradabilité totale, deux unités pilotes de traitement de boues activées sont utilisées en parallèle [unités d'essai de confirmation de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) ou vases poreux]. Dans l'une des unités, la substance d'essai est ajoutée au milieu entrant (eaux résiduaires synthétiques ou domestiques), tandis que l'autre est uniquement alimenté avec le milieu. Pour la détermination de la biodégradabilité primaire avec analyse spécifique dans les milieux d'entrées et de sortie, seule une unité est utilisée.

On mesure les concentrations de COD (ou la DCO) dans les effluents ou bien on détermine les concentrations de la substance par analyse spécifique.

Le COD dû à la substance d'essai n'est pas mesuré, mais simplement mentionné.

Lorsque l'on mesure le COD (ou la DCO), la différence de concentration moyenne entre l'effluent d'essai et l'effluent témoin est censée être due à la substance d'essai non dégradée.

Lorsque l'on effectue des analyses spécifiques, la modification de la concentration de la molécule mère peut être mesurée (biodégradation primaire).

Les unités peuvent fonctionner en «couplage», selon un procédé de transinoculation.

### 1.5. Critères de qualité

La concentration initiale de la substance dépend du type d'analyse effectué et de ses limites.

### 1.6. Description de la méthode d'essai

#### 1.6.1. Préparation

##### 1.6.1.1. Appareillage

Deux unités de même type sont nécessaires, sauf pour les analyses spécifiques. Deux types de dispositif peuvent être utilisés:

Essai de confirmation de l'OCDE:

L'équipement (appendice 1) se compose d'un récipient (A) pour stocker les eaux résiduaires synthétiques, d'une pompe doseuse (B), d'une cuve d'aération (C), d'un décanteur (D), d'une pompe à air comprimé (E) pour recycler la boue activée et d'un récipient (F) pour recueillir l'effluent traité.

Les récipients (A) et (F) doivent être en verre ou en matière plastique appropriée et contenir au moins 24 litres. La pompe (B) doit assurer une alimentation régulière de la cuve d'aération en effluent synthétique; tout système approprié peut être utilisé, à condition que le débit d'entrée et la concentration soient assurés.

En fonctionnement normal, le décanteur (D) est fixé à une hauteur telle que la cuve d'aération contienne 3 litres de liqueur mixte. Un aérateur fritté (G) est suspendu dans la cuve (C) au-dessus du cône. La quantité d'air insufflée par le dispositif d'aération doit être contrôlée par un débitmètre. La pompe à air comprimé (E) est réglée de façon que la boue activée provenant du décanteur soit continuellement et régulièrement recyclée dans la cuve d'aération (C).

«Vase poreux»:

Le vase poreux est réalisé à partir de feuilles de polyéthylène poreux (2 mm d'épaisseur, taille maximale des pores: 95  $\mu$ ) formant des cylindres de 14 cm de diamètre à base conique de 45° (figures 1 et 2 de l'appendice 27). Le vase poreux se trouve dans une cuve étanche en matière plastique appropriée de 15 cm de diamètre, pourvue dans la partie cylindrique, à la hauteur de 17,2 cm, d'un orifice qui détermine la capacité du vase (3 l). Un anneau de support rigide réalisé en matière plastique appropriée entoure le sommet du vase, de sorte qu'il y a un espace de 0,5 cm entre le vase et la cuve.

Les vases poreux peuvent être montés à la base d'un bain-marie thermostatisé. À la base du vase est prévue une alimentation en air sur laquelle sont placés des diffuseurs.

Les récipients (A) et (E) doivent être en verre ou en matière plastique appropriée et avoir une capacité d'au moins 24 litres. La pompe (B) doit assurer une alimentation régulière de la cuve d'aération en effluent synthétique; tout système approprié peut être utilisé, à condition que le débit d'entrée et la concentration soient assurés.

Des vases poreux de rechange doivent être disponibles pour remplacer ceux qui pourraient se boucher à l'usage; les vases bouchés sont nettoyés par immersion pendant 24 heures dans une solution d'hypochlorite suivie d'un rinçage à l'eau du robinet.

1.6.1.2. Filtration

Appareil de filtration sur membranes filtrantes avec des pores de 0,45  $\mu$ m. Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'absorbent pas la substance d'essai au cours de la filtration.

1.6.1.3. Eaux résiduaires

On peut utiliser soit des effluents synthétiques appropriés, soit des eaux résiduaires domestiques.

Exemple d'effluent synthétique:

Dissoudre par litre d'eau du robinet:

Peptone:	160 mg,
Extrait de viande:	110 mg,
Urée:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O:	4 mg,
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O:	2 mg,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	28 mg.

Eaux résiduaires domestiques:

Les eaux résiduaires domestiques doivent être recueillies chaque jour au niveau du trop-plein de la cuve de décantation primaire d'une installation de traitement d'eaux résiduaires essentiellement domestiques.

1.6.1.4. Solution de réserve de la substance d'essai

Une solution de la substance d'essai, par exemple à 1 %, doit être préparée pour être introduite dans l'unité d'essai. La concentration de la substance doit être déterminée de façon que soit connu le volume approprié à ajouter aux eaux résiduaires ou directement à l'unité par le moyen d'une pompe secondaire afin d'obtenir la concentration d'essai requise.

1.6.1.5. Inoculum

*Remarque:* Avec des eaux résiduaires domestiques, il serait superflu d'utiliser un inoculum à faible concentration bactérienne, mais on peut utiliser des boues activées.

On peut utiliser plusieurs types d'inoculum. Nous donnons ici trois exemples d'inoculum appropriés:

a) Inoculum à base d'effluent secondaire:

L'inoculum doit être obtenu à partir d'un effluent secondaire de bonne qualité, provenant d'une installation de traitement d'eaux résiduaires essentiellement domestiques. Cet effluent doit être aéré depuis le prélèvement jusqu'à l'utilisation. Il est filtré sur un filtre grossier, les 200 premiers millilitres étant éliminés. Le filtrat, convenablement aéré, doit être utilisé le jour même. Il faut utiliser au moins 3 ml pour l'inoculation.

b) Inoculum composite:

Inoculum à base d'effluent secondaire:

Voir description ci-dessus.

Inoculum à base de terre:

100 g de terre de jardin (fertile, non stérile) sont mis en suspension dans 1 000 ml d'eau potable exempté de chlore (les terres à très forte teneur en argile, sable ou humus ne peuvent être utilisées). Après agitation, il y a lieu de laisser reposer la suspension durant 30 minutes. Le surnageant est alors filtré sur un papier filtre grossier, les 200 premiers millilitres étant éliminés. Le filtrat est aéré immédiatement, et cela jusqu'à son utilisation. Il doit être utilisé le jour même.

Inoculum à base d'eau de surface:

Un échantillon d'eau de surface mésosaprobe est filtré sur un papier filtre grossier, les 200 premiers millilitres étant éliminés. Le filtrat, convenablement aéré jusqu'à son utilisation, doit être utilisé le jour même.

Pour obtenir l'inoculum final, on mélange avec soin des volumes égaux de ces trois types d'échantillons d'inoculum. Il faut utiliser au moins 3 ml pour l'inoculation.

c) Inoculum à base de boue activée:

On peut utiliser comme inoculum un volume (ne dépassant pas 3 l) de boue activée (dont la teneur en solides en suspension peut atteindre jusqu'à 2,5 g/l), prélevé dans le bassin d'aération d'une installation de traitement d'eaux résiduaires essentiellement domestiques.

1.6.2. *Mode opératoire*

L'essai est effectué à la température ambiante; celle-ci doit être maintenue entre 18 °C et 25 °C.

L'essai peut être effectué s'il y a lieu à une température inférieure (qui peut descendre jusqu'à 10 °C): si la substance est dégradée, on peut s'en tenir là. Si toutefois la substance n'est pas dégradée, l'essai doit être effectué à une température constante située entre 18 °C et 25 °C.

1.6.2.1. *Période initiale: formation des boues/stabilisation des unités*

La période de formation des boues/stabilisation est la période pendant laquelle la concentration des solides en suspension dans les boues activées et les performances des unités augmentent jusqu'à atteindre un état stationnaire dans les conditions de fonctionnement utilisées.

La période initiale est la période qui s'écoule entre la première addition de substance d'essai et le moment où la dégradation atteint un plateau (valeur relativement constante). Cette période ne doit pas dépasser 6 semaines.

La période d'évaluation est une période de 3 semaines à compter du moment où la dégradation de la substance d'essai atteint une valeur relativement constante, habituellement élevée. Pour les substances qui ne se dégradent pas ou se dégradent peu au cours des 6 premières semaines, on prend comme période d'évaluation les 3 semaines suivantes.

Tout d'abord, remplir les unités nécessaires pour un essai avec l'inoculum mélangé au liquide entrant.

Mettre ensuite en marche le dispositif d'admission d'air [et la pompe à air comprimé (E) dans le cas des unités d'essai de confirmation de l'OCDE], ainsi que le doseur (B).

Le liquide entrant ne contenant pas la substance d'essai doit traverser la cuve d'aération à un débit horaire de 1 l ou 1/2 l, ce qui donne un temps moyen de rétention de 3 ou 6 heures.

Il faut régler le débit d'air de façon que le contenu de la cuve (C) reste constamment en suspension et que le taux d'oxygène dissout soit au minimum de 2 mg/l.

La formation de mousse doit être empêchée par des moyens appropriés. On n'utilisera cependant pas d'agents antimousse ayant une action inhibitrice sur la boue activée.

La boue qui s'est accumulée au sommet de la cuve d'aération (C) [et, dans le cas des unités d'essai de confirmation de l'OCDE, au fond du décanteur (D) et dans le circuit] doit être renvoyée dans la liqueur mixte au moins une fois par jour par brossage ou par tout autre moyen approprié.

Quand la boue ne décante pas, on peut en augmenter la densité par addition, répétée si nécessaire, de fractions de 2 ml d'une solution à 5% de chlorure ferrique.

L'effluent est recueilli dans le récipient (E ou F) pendant 20 à 24 heures et on prélève un échantillon après avoir procédé à l'homogénéisation du mélange. Le récipient (E ou F) doit être nettoyé soigneusement.

Pour vérifier l'efficacité du procédé, on mesure au moins deux fois par semaine la demande chimique en oxygène (DCO) ou le carbone organique dissout (COD) du filtrat de l'effluent collecté, ainsi que du liquide entrant filtré [à l'aide d'une membrane dont les pores ont 0,45 µm de diamètre, les 20 premiers millilitres (environ) du filtrat étant éliminés].



La diminution de la DCO ou du COD doit se stabiliser lorsque la dégradation journalière est à peu près régulière.

La teneur en matières sèches de la boue activée contenue dans la cuve d'aération doit être déterminée deux fois par semaine (en g/l). On peut faire fonctionner les installations de deux manières: ou bien la teneur en matières sèches de la boue activée est déterminée deux fois par semaine et si elle est supérieure à 2,5 g/l, il faut éliminer l'excès de boue activée; ou bien on enlève 500 ml de liqueur mixte de chaque vase tous les jours pour obtenir un temps moyen de rétention de la boue de six jours.

Quand les paramètres mesurés et estimés [efficacité du procédé (disparition de la DCO ou du COD), concentration de la boue, sédimentabilité de la boue, turbidité des effluents, etc.] des deux unités sont suffisamment stables, la substance d'essai peut être introduite dans le liquide entrant dans l'une des unités suivant 1.6.2.2.

Une autre solution consiste à ajouter la substance d'essai au début de la période de formation de la boue (1.6.2.1.), notamment lorsque la boue est ajoutée comme inoculum.

#### 1.6.2.2. Essai

Les conditions de fonctionnement de la période initiale sont maintenues et une quantité suffisante de solution de réserve de la substance d'essai (à environ 1 %) est ajoutée au liquide entrant dans l'unité d'essai, de façon à obtenir la concentration désirée de la substance d'essai (approximativement 10 ou 20 mg de COD/l ou 40 mg de DOC/l) dans les eaux résiduaires. Pour ce faire, on peut soit mélanger quotidiennement la solution de réserve aux eaux résiduaires, soit utiliser un système de pompage séparé. Cette concentration peut être atteinte progressivement. Si la substance d'essai n'a pas d'effets toxiques sur la boue activée, des concentrations plus fortes peuvent être essayées.

Dans l'unité témoin ne sont injectées que les eaux résiduaires. Des volumes adéquats des effluents sont prélevés pour analyse et filtrés sur membrane (0,45 µm), les 20 premiers millilitres (environ) du filtrat étant éliminés.

Les échantillons filtrés doivent être analysés le jour même; sinon, ils doivent être conservés d'une manière adéquate, par exemple à l'aide de 0,05 ml d'une solution de chlorure mercurique à 1 % (HgCl<sub>2</sub>) pour 10 ml de filtrat ou par stockage à 2 à 4 °C pendant 24 heures ou à moins de -18 °C pendant plus longtemps.

La période initiale, qui comprend l'addition de la substance d'essai, ne doit pas dépasser 6 semaines et la période d'évaluation ne doit pas être inférieure à 3 semaines, c'est-à-dire qu'environ 14 à 20 déterminations doivent être pratiquées pour le calcul du résultat final.

Couplage des unités:

On réalise le couplage des unités en interchangeant une fois par jour 1,5 l de liqueur mixte (y compris la boue) provenant des cuves d'aération des boues activées entre les deux unités. Dans le cas de substances d'essai très absorbantes, on prélève seulement un volume de 1,5 l de surnageant dans les cuves de décantation pour le verser dans le récipient de boue activée de l'autre unité.

#### 1.6.2.3. Analyse

Deux types d'analyses peuvent être effectuées en vue de suivre le comportement de la substance:

COD et DCO:

Les concentrations de COD sont déterminées en double avec l'analyseur de carbone et/ou les valeurs de la DCO sont déterminées conformément à la référence (2).

Analyse spécifique:

Les concentrations de la substance d'essai sont déterminées par une méthode d'analyse appropriée. On doit si possible procéder à une détermination spécifique de la substance absorbée sur la boue.

## 2. DONNÉES ET ÉVALUATION

### 2.1. Couplage d'unités

Dans le cas du «couplage des unités», les pourcentages quotidiens de dégradation TD sont calculés conformément à 1.2.1.

Ces taux journaliers de dégradation TD sont, en raison du transfert de matière dû au procédé de transinoculation, corrigés en TDc à l'aide de l'équation (2) pour un temps moyen de rétention de 3 heures ou à l'aide de l'équation (3) pour un temps moyen de rétention de 6 heures.

$$T_{Dc} = \frac{8}{7} TD - \frac{100}{7} \quad (2)$$

$$T_{Dc} = \frac{4}{3} TD - \frac{100}{3} \quad (3)$$

On calcule la moyenne de la série des valeurs de  $T_{Dc}$  et, en plus, l'écart type selon d'équation (4).

$$S_{T_{Dc}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{T_{Dc}} - T_{Dc_i})^2}{n-1}} \quad (4)$$

où:

$S_{T_{Dc}}$  = écart type de la série des valeurs de  $T_{Dc}$ ,

$\overline{T_{Dc}}$  = moyenne des valeurs de  $T_{Dc}$ ,

$n$  = nombre de déterminations.

On élimine les valeurs extrêmes de la série des  $T_{Dc}$  conformément à une méthode de statistique appropriée, par exemple celle de Nalimov (-6), au niveau de probabilité de 95 % et on recalcule la moyenne et l'écart type de la série des données  $T_{Dc}$  moins ces valeurs extrêmes.

Le résultat final est donné par l'équation (5):

$$T_{Dc} = \overline{T_{Dc}} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{T_{Dc}} \quad (5)$$

où:

$t_{n-1; \alpha}$  = valeur du tableau de  $t$  pour  $n$  paires de valeurs de  $E$  et  $E_Q$  et le niveau de confiance statistique  $P$  ( $P = 1 - \alpha$ ), où  $P$  est fixé à 95 % (1).

Le résultat est exprimé par la moyenne avec les limites de tolérance au niveau de probabilité de 95 %, l'écart type et le nombre de données de la série des  $T_{Dc}$ , moins les valeurs extrêmes, par exemple:

$T_{Dc} = 98,6 \pm 2,3\%$  de disparition de COD,

$s = 4,65\%$  de disparition de COD,

$n = 18$ ,

$x$  = nombre de valeurs extrêmes.

## 2.2. Unités non couplées

La performance des unités peut être vérifiée comme suit:

$$\text{Pourcentage de disparition} = \frac{\text{DCO ou COD des eaux résiduaires} - \text{DCO ou COD de l'effluent}}{\text{DCO ou COD des eaux résiduaires}} \times 100$$

Cette dégradation quotidienne peut être portée sur un graphique montrant par exemple les tendances à l'acclimatation.

### 2.2.1. Détermination de la DCO/du COD

On calcule le taux quotidien de dégradation TD conformément à 1.2.1.

On calcule la moyenne de la série des valeurs TD et, en plus, son écart type conformément à la formule suivante:

$$S_{TD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{TD} - TD_i)^2}{n-1}} \quad (6)$$

où:

$S_{TD}$  = écart type de la série des valeurs  $TD_i$ ,

$\overline{TD}$  = moyenne des valeurs  $TD_i$ ,

$n$  = nombre de déterminations.

On élimine les valeurs extrêmes de la série des TD conformément à une méthode de statistique appropriée, par exemple celle de Nalimov (6), au niveau de probabilité de 95 % et on recalcule la moyenne et l'écart type de la série des données TD, moins les valeurs extrêmes.

Le résultat final est donné par l'équation (7):

$$TD = \overline{TD} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{TD} \quad (7)$$

où:

$t_{n-1;\alpha}$  = valeur du tableau de t pour n paires de valeurs de E et de  $E_0$  et le niveau de confiance statistique P ( $P = 1 - \alpha$ ), où  $\alpha$  est fixé à 95 % (1).

Le résultat est exprimé par la moyenne avec les limites de tolérance au niveau de probabilité de 95 %, l'écart type et le nombre de données de la série des TD moins les valeurs extrêmes, par exemple:

TD = (98,6 ± 2,3%) de disparition de COD,

s = 4,65 % de disparition de COD,

n = 18,

x = nombre de valeurs extrêmes.

#### 2.2.2. Analyse spécifique

On calcule le pourcentage d'élimination de la substance d'essai et de la phase aqueuse ( $R_w$ ) conformément à 1.2.2.

### 3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

#### 3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

- le formulaire donné à l'annexe III, indiquant les conditions de fonctionnement de l'essai,
- l'appareillage choisi (essai de confirmation de l'OCDE ou vase poreux),
- le mode de fonctionnement choisi: unités couplées ou non,
- les eaux résiduaires: synthétiques ou domestiques. Dans le cas d'eaux résiduaires domestiques: date et lieu de prélèvement de l'échantillon,
- l'inoculum, avec date et lieu de prélèvement de l'échantillon,
- une description de la méthode d'analyse si des analyses spécifiques ont été effectuées,
- le diagramme de la disparition de la DCO ou du COD en fonction du temps pendant la période initiale et la période d'évaluation,
- une mesure analytique de la substance d'essai sous la forme de DCO ou de COD dans la solution de réserve,
- si des analyses spécifiques ont été effectuées, le diagramme du pourcentage d'élimination de la substance d'essai de la phase aqueuse en fonction du temps (période initiale et période d'évaluation),
- la disparition moyenne du COD ou de la DCO de la substance d'essai et l'écart type sont calculés à partir des résultats de la période d'évaluation, c'est-à-dire lorsqu'il y a disparition régulière de la substance d'essai ou qu'on se trouve en période de fonctionnement stationnaire,
- un diagramme de la concentration des boues activées en fonction du temps,
- toute remarque concernant les boues activées (rejet d'un excès de boues, présence d'un agglomérat,  $FeCl_3$ , etc.),
- la concentration de la substance utilisée pour l'essai,
- tous les résultats concernant l'analyse faite sur la boue,
- toutes informations et tous résultats expérimentaux concernant la substance d'essai et, les cas échéant, la substance de référence,
- les raisons scientifiques de toutes modifications de mode opératoire.

### 3.2. Interprétation des résultats

Une faible élimination de la substance d'essai de la phase aqueuse peut être due à une inhibition des micro-organismes par la substance d'essai. Celle-ci peut également être révélée par une lyse et une perte de boue, donnant un surnageant turbide, et par une diminution de l'efficacité de l'installation pilote au point de vue de l'élimination de la DCO (ou du COD).

L'adsorption physico-chimique peut parfois jouer un rôle. Des différences entre l'action biologique sur la molécule et l'adsorption physico-chimique peuvent être révélées par une analyse effectuée sur la boue après une désorption adéquate.

Des essais complémentaires sont nécessaires si l'on veut faire une distinction entre biodégradation (ou biodégradation partielle) et adsorption.

On peut y procéder de différentes façons, mais la plus convaincante consiste à utiliser le surnageant comme inoculum dans un essai du niveau de base de préférence (essai respirométrique).

Les fortes pertes de COD et de DCO éventuellement observées sont dues à la biodégradation, tandis que pour de faibles pertes, on ne peut distinguer la biodégradation de l'élimination. Par exemple, si un composé soluble présente une constante d'adsorption de 98 % et si le taux d'enlèvement de boues excédentaires est de 10 % par jour, une élimination atteignant jusqu'à 40 % est possible; pour un taux d'enlèvement de boues excédentaires de 30 %, l'élimination due à l'adsorption et à l'enlèvement de boues excédentaires peut atteindre jusqu'à 65 % (4).

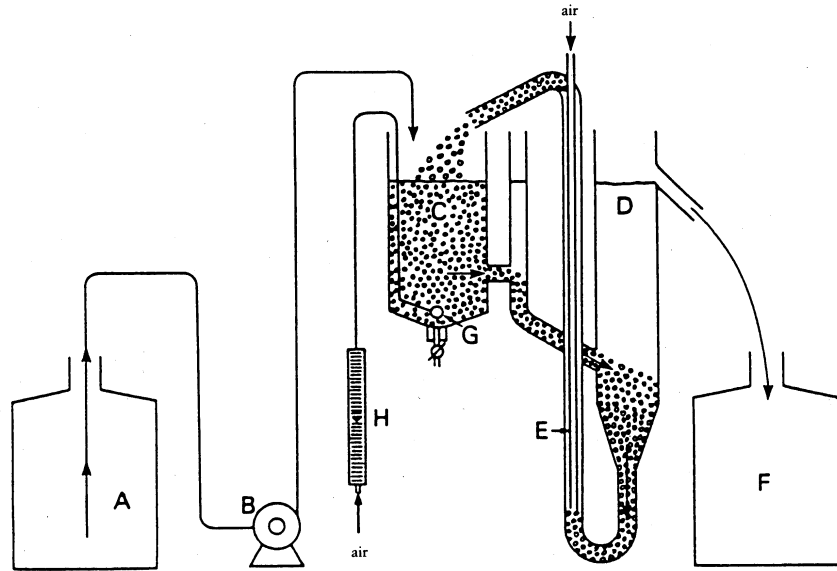
Dans le cas d'une analyse spécifique, il convient d'accorder une grande attention à la relation entre la structure de la substance et l'analyse spécifique effectuée. Dans ce cas, le phénomène observé ne peut être interprété comme une minéralisation de la substance.

### 4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 303 A*, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Annexe V, C. 9. «Essai de dégradation — demande chimique en oxygène», de la directive 84/449/CCE, *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 251 du 19 septembre 1984.
- (3) Painter, H. A., King, E. F., WRC *Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Center, United Kingdom.
- (4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, p. 161 à 171.
- (5) Directives 82/242/CEE et 82/423/CEE du Conseil *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 109 du 22 avril 1982, modifiant les directives 73/404/CEE et 73/405/CEE du Conseil sur la biodégradabilité des détergents *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 347 du 17 décembre 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), p. 406 à 409.

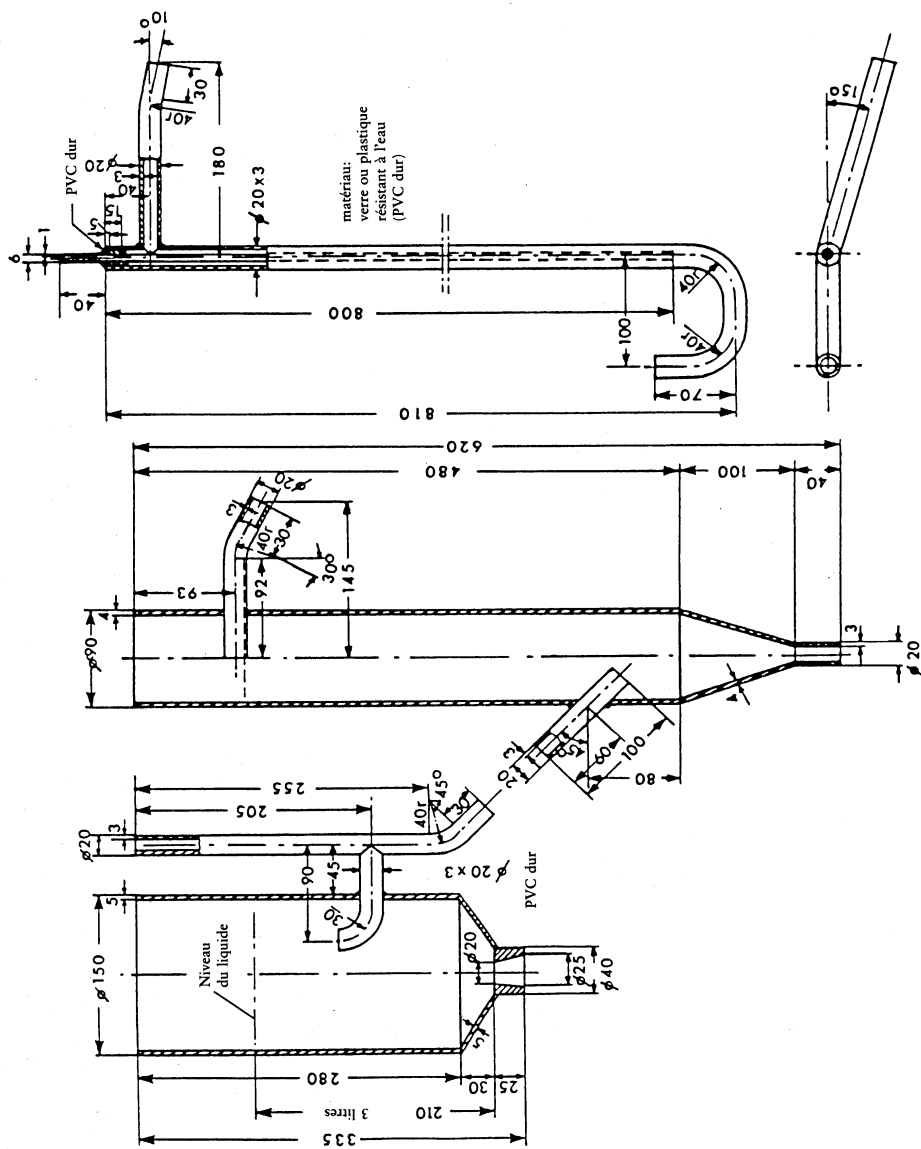
Appendice 1

Figure 1



Légende: A: récipient de stockage;  
B: pompe doseuse;  
C: cuve d'aération (capacité: 3 l);  
D: décanteur;  
E: pompe à air comprimé;  
F: récipient collecteur;  
G: aérateur;  
H: débitmètre à air (option)

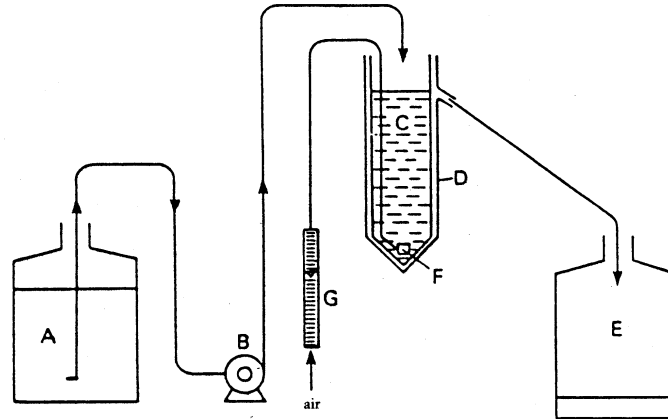
Figure 2



Appendice 2

Figure 1

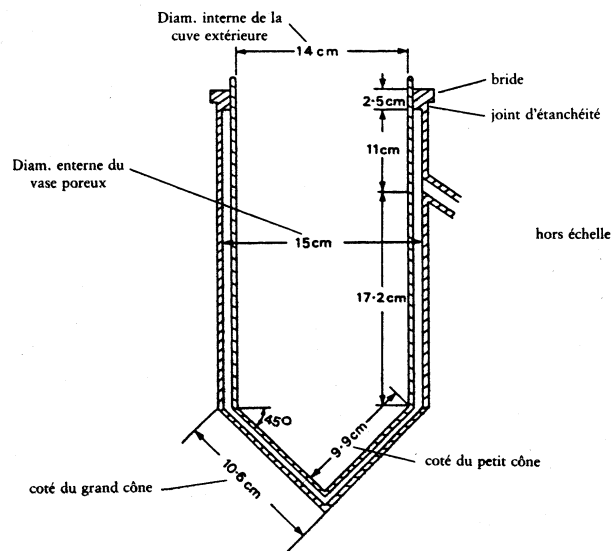
Équipement utilisé pour évaluer la biodégradabilité



- Légende: A: récipient de stockage;  
 B: pompe doseuse;  
 C: vase d'aération poreux;  
 D: cuve étanche;  
 E: collecteur de l'effluent;  
 F: aérateur à diffuseur;  
 G: rotamètre (option)

Figure 2

Détail du vase d'aération poreux de 3 litres



Appendice 3

Conditions de l'essai de simulation des boues activées

Vérifier dans chaque groupe

*Appareillage*

Confirmation OCDE  
Vase poreux


*Mode de fonctionnement*

Unité simple  
Unités couplées  
Unités non couplées


*Transinoculation*

Néant  
Boues activées  
Surnageant


*Temps moyen de rétention*

3 heures  
6 heures


*Élément nutritif de base*

Eaux résiduaires domestiques  
Eaux résiduaires synthétiques


*Inoculum*

Effluent secondaire  
Composite  
Boue activée


*Addition de la substance d'essai*

Dès le début  
Augmentation progressive  
Après formation de la boue


*Analyse*

Spécifique  
DCO  
COD




## C. 11

### BIODÉGRADATION

#### BOUES ACTIVÉES: ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION

#### 1. MÉTHODE

##### 1.1. Introduction

La méthode décrite évalue l'effet d'une substance d'essai sur les micro-organismes en mesurant le rythme de respiration dans des conditions déterminées, en présence de différentes concentrations de la substance.

L'objectif de cette méthode est de fournir un procédé de sélection rapide permettant d'identifier les substances d'essai qui peuvent nuire au fonctionnement des installations de traitement biologique aérobie et de faire une estimation des concentrations adéquates non inhibitrices des substances d'essai à utiliser dans les expériences de biodégradabilité.

Un essai de détermination de l'ordre de grandeur peut précéder l'essai plus complet. Il fournit des informations sur la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai principal.

En plus des essais avec la substance étudiée, on effectue deux essais témoins, l'un au début et l'autre à la fin de série expérimentale. Chaque lot de boue activée doit également être vérifié à l'aide d'une substance de référence.

Cette méthode s'applique surtout aux substances qui, en raison de leur solubilité dans l'eau et de leur faible volatilité, sont susceptibles de demeurer dans l'eau.

Pour les substances dont la solubilité dans le milieu d'essai est limitée, il peut ne pas être possible de déterminer la  $CE_{50}$ .

Les résultats basés sur la consommation d'oxygène peuvent mener à des conclusions erronées lorsqu'une substance d'essai a tendance à interférer sur la phosphorylation oxydative.

Il est utile de disposer des informations suivantes pour faire l'essai:

- solubilité dans l'eau,
- tension de vapeur,
- formule de structure,
- pureté de la substance d'essai.

##### *Recommandation:*

Les boues activées peuvent contenir des organismes pathogènes et doivent être manipulées avec prudence.

##### 1.2. Définitions et unités

Le taux de respiration est la consommation d'oxygène des micro-organismes aérobies contenus dans les boues ou dans les eaux usées, exprimée généralement en  $mg O_2$  par milligramme de boue, par heure.

Pour calculer l'effet inhibiteur d'une substance d'essai, à une concentration donnée, le taux de respiration est exprimé en pourcentage de la moyenne des taux de respiration des deux témoins:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{C_1} + R_{C_2}}\right) \times 100 = \text{pourcentage d'inhibition}$$

où:

$R_s$  = taux de consommation de l'oxygène à une concentration donnée en substance étudiée,

$R_{C_1}$  = taux de consommation d'oxygène du témoin  $C_1$ ,

$R_{C_2}$  = taux de consommation d'oxygène du témoin  $C_2$ .

Dans cette méthode, la  $CE_{50}$  est la concentration de la substance d'essai pour laquelle le taux de respiration est égal à 50 % de celui des témoins dans les conditions décrites.

1.3. **Substance de référence**

Il est recommandé d'utiliser comme substance de référence le 3,5-dichlorophénol, qui est un inhibiteur connu de la respiration. Pour chaque lot de boue activée, on mesure la  $CE_{50}$  de cette substance, afin de déterminer si la sensibilité de la boue n'est pas anormale.

1.4. **Principe de la méthode d'essai**

On mesure le taux de respiration d'une boue activée alimentée en une quantité donnée d'effluent synthétique après un temps de contact de 30 minutes ou de 3 heures, ou à ces deux moments. On mesure également dans des conditions identiques le taux de respiration de la même boue activée en présence de la substance d'essai à différentes concentrations. L'effet inhibiteur de la substance d'essai à une concentration donnée s'exprime en pourcentage de la valeur moyenne des taux de respiration des deux témoins. À partir des déterminations faites à différentes concentrations, on calcule une valeur de la  $CE_{50}$ .

1.5. **Critères de qualité**

Les résultats sont valables si:

- les taux de respiration des deux témoins ne diffèrent pas l'un de l'autre de plus de 15%,
- la  $CE_{50}$  (30 minutes et/ou 3 heures) du 3,5-dichlorophénol se situe dans l'intervalle 5 à 30 mg/l.

1.6. **Description de la méthode d'essai**

1.6.1. **Réactifs**

1.6.1.1. **Solutions de la substance d'essai**

Des solutions de la substance d'essai sont préparées au début de l'essai à partir d'une solution de réserve. Une solution de réserve à 0,5 g/l convient quand le mode opératoire indiqué ci-dessous est suivi.

1.6.1.2. **Solution de la substance de référence**

On peut préparer par exemple une solution de 3,5-dichlorophénol en dissolvant 0,5 g de 3,5-dichlorophénol dans 10 ml de 1M NaOH, en diluant à 30 ml à l'eau distillée, en ajoutant, tout en agitant, du 0,5M  $H_2SO_4$  jusqu'au point où la précipitation commence — environ 8 ml sont nécessaires — et, enfin, en diluant à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH devrait alors être compris dans l'intervalle 7 à 8.

1.6.1.3. **Effluent synthétique**

On prépare un effluent synthétique en dissolvant les quantités suivantes de substance dans 1 litre d'eau:

- 16 g de peptone,
- 11 g d'extrait de viande,
- 3 g d'urée,
- 0,7 g de NaCl,
- 0,4 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,
- 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,
- 2,8 g de  $K_2HPO_4$ .

*Note 1:* Cet effluent synthétique est 100 fois plus concentré que celui décrit dans le rapport technique de l'OCDE «Méthode proposée pour la détermination de la biodégradabilité des agents tensio-actifs utilisés dans les détergents synthétiques» du 11 juin 1976, et contient en outre de l'hydrogénophosphate de potassium.

*Note 2:* Si le milieu ainsi préparé n'est pas immédiatement utilisé, il sera stocké à l'obscurité, entre 0 et 4 °C pendant une durée maximale d'une semaine, dans des conditions qui ne conduiront à aucun changement en ce qui concerne sa composition. Le milieu peut aussi être stérilisé avant son stockage, ou bien la peptone et l'extrait de viande peuvent être ajoutés immédiatement avant le début de l'essai. Avant son emploi, le milieu sera agité avec soin et son pH sera ajusté.

1.6.2. **Équipement**

Appareil de mesure: aucune prescription n'est fournie à ce sujet. Toutefois, il faut veiller à ce qu'il n'y ait pas de volume libre au-dessus du liquide et à ce que l'électrode s'adapte parfaitement au récipient.

Un équipement normal de laboratoire et notamment les articles suivants sont nécessaires:

- appareil de mesure,
- dispositif d'aération,
- électrode et appareil de mesure pour le pH,
- électrode à oxygène.

### 1.6.3. Préparation de l'inoculum

Comme inoculum pour l'essai, on utilise de la boue activée provenant d'une installation de traitement des eaux usées traitant un effluent à dominance domestique.

En cas de nécessité, à l'arrivée au laboratoire, les grosses particules pourront être éliminées par sédimentation pendant une courte période, par exemple pendant 15 minutes, puis par décantation des particules fines de la couche supérieure. Comme solution alternative, la boue peut être agitée quelques secondes au moyen d'un mixeur.

Si des produits inhibiteurs sont présents la boue peut être lavée avec de l'eau du robinet ou avec la solution isotonique. Après centrifugation, le surnageant est décanté (cette manipulation est répétée 3 fois).

Une petite quantité de boue est pesée et séchée. À partir de ce résultat, il est possible de déterminer la quantité de boue activée préparée de la façon décrite ci-dessus; elle est ensuite aérée toute la nuit à  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Elle est alors conservée sous aération en vue de son emploi dans la journée. Avant de l'utiliser, on vérifie le pH et, si nécessaire, on l'ajuste de façon à atteindre un pH se situant entre 6,0 et 8,0. La teneur en matière en suspension du mélange peut être déterminée selon la méthode décrite dans le précédent paragraphe.

Si la boue ne peut être utilisée le jour même de sa collecte, on ajoute 50 ml d'effluent synthétique à chaque litre de boue activée préparée de la façon décrite ci-dessus; elle est ensuite aérée toute la nuit à  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Elle est alors conservée sous aération en vue de son emploi dans la journée. Avant de l'utiliser, on vérifie le pH et, si nécessaire, on l'ajuste de façon à atteindre un pH se situant entre 6,0 et 8,0. La teneur en matière en suspension du mélange peut être déterminée selon la méthode décrite dans le précédent paragraphe.

Si l'on doit utiliser le même lot de boue pendant plusieurs jours consécutifs (4 au maximum), on ajoute un autre volume de 50 ml d'effluent synthétique par litre de boue à la fin de chaque jour de travail.

### 1.6.4. Exécution de l'essai

Durée/temps de contact:	30 minutes et/ou 3 heures, pendant lesquelles le milieu d'essai est aéré
Eau:	Eau potable (déchlorurée, si nécessaire)
Apport d'air:	Air propre, exempt d'huile. Débit d'air de 0,5 à 1 litre par minute
Appareil de mesure:	Fiole à fond plat du type DBO
Mesure de l'oxygène:	Électrode à oxygène adéquate, avec enregistrement
Solution nutritive:	Effluent synthétique (voir ci-dessus)
Substance d'essai:	Préparée au début de l'essai
Substance de référence:	Par exemple 3,5-dichlorophénol (au moins 3 concentrations)
Témoins:	Échantillon inoculé, sans substance d'essai
Température:	$20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

On trouvera ci-après une méthode expérimentale pouvant être appliquée à la fois pour la substance d'essai et pour la substance de référence pendant une période de 3 heures:

On utilise plusieurs récipients (par exemple bechers d'un litre). On peut utiliser au moins 5 concentrations croissantes, selon une progression de raison n'excédant pas 3,2.

Au temps «O», on verse 16 ml d'effluent synthétique dans un verre cylindrique graduée de 500 ml et l'on complète à 300 ml avec de l'eau. On ajoute 200 ml d'inoculum bactérien et l'on verse l'ensemble du mélange dans le premier récipient (premier témoin C<sub>1</sub>).

Les récipients d'essai doivent être aérés en continu de façon à être certain que les concentrations en oxygène dissout ne seront pas inférieures à 2,5 mg/l et qu'immédiatement avant détermination du taux de respiration, la concentration en oxygène dissout sera au moins égale à 6,5 mg/l.

Au temps «15 minutes» (15 minutes représentant un intervalle de temps arbitraire, mais commode), on répète l'opération précédente, sauf que l'on ajoute 100 ml de la solution de réserve de la substance d'essai aux 16 ml d'effluent synthétique avant de procéder à l'addition d'eau jusqu'à 300 ml et d'inoculum jusqu'à 500 ml. Ce mélange est ensuite versé dans le deuxième récipient, puis aéré comme ci-dessus. On recommence cette opération toutes les 15 minutes avec différents volumes de la solution de réserve de la substance d'essai, afin d'obtenir une série de récipients avec des concentrations différentes en substance d'essai. Enfin, on prépare un deuxième témoin (C<sub>2</sub>).

Au bout de trois heures, on mesure et note le pH; un échantillon homogène du contenu du premier récipient est versé dans l'appareil de mesure et le taux de respiration est mesuré pendant une période allant jusqu'à 10 minutes.

Cette détermination est répétée sur le contenu de chaque récipient à des intervalles de 15 minutes, de manière à obtenir un temps de contact de 3 heures pour chaque récipient.

La substance de référence est testée de la même façon sur chaque lot d'inoculum bactérien.

Une organisation différente (par exemple plus d'un appareil de mesure d'oxygène) est nécessaire, si les mesures doivent être faites après un contact de 30 minutes.

S'il est nécessaire de mesurer la consommation chimique en oxygène, on ajoute des récipients supplémentaires contenant la substance d'essai, l'effluent synthétique, de l'eau, mais pas de boue activée.

La consommation d'oxygène est mesurée et enregistrée après un temps d'aération de 30 minutes et/ou de 3 heures (temps de contact).

## 2. TRAITEMENT ET ÉVALUATION DES DONNÉES

Le taux de respiration est calculé à partir du tracé de l'enregistreur en mg O<sub>2</sub>/l.h pour les concentrations comprises approximativement entre 6,5 mg de O<sub>2</sub>/l et 2,5 mg de O<sub>2</sub>/l, ou pendant une période de dix minutes quand le taux de respiration est faible. La partie de la courbe à partir de laquelle on mesure le taux de respiration doit être linéaire.

Si les taux de respiration des deux témoins diffèrent l'un de l'autre de plus de 15% ou si la CE<sub>50</sub> (30 minutes et/ou 3 heures) de la substance de référence n'est pas dans l'intervalle requis (5 à 30 mg/l pour le 3,5-dichlorophénol), l'essai n'est pas valable et doit être recommencé.

Le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque concentration d'essai (voir 1.2). On porte le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration sur du papier log-normal (ou log-probabilité) et on en déduit une valeur de la CE<sub>50</sub>.

Des limites de confiance à 95% pour les valeurs de la CE<sub>50</sub> peuvent être déterminées par application de méthodes normalement utilisées.

## 3. RAPPORT

### 3.1. Rapport d'essai

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

- substance d'essai: données permettant son identification,
- système d'essai: origine, concentration et traitement préalable éventuel de la boue activée,
- conditions d'essai:
  - pH du mélange avant mesure de la consommation d'oxygène,
  - température d'essai,
  - durée de l'essai,
  - substance de référence et CE<sub>50</sub> mesurée,
  - consommation chimique d'oxygène (s'il y a lieu),
- résultats:
  - toutes les données obtenues,
  - courbe d'inhibition et méthode de calcul de la CE<sub>50</sub>,
  - CE<sub>50</sub> et, si possible, limites de confiance à 95%, CE<sub>20</sub> et CE<sub>80</sub>,
  - toutes les observations et tous les écarts par rapport à la méthode d'essai qui auraient pu influencer les résultats.

### 3.2. Interprétation des données

La valeur de la CE<sub>50</sub> doit simplement être considérée comme une indication de la toxicité probable de la substance d'essai pour le traitement des eaux usées par des boues activées ou pour les micro-organismes des eaux usées. En effet, les interactions complexes qui se produisent dans l'environnement ne peuvent pas être simulées avec précision dans un essai de laboratoire. En outre, les substances testées qui pourraient avoir des effets inhibiteurs sur l'oxydation de l'ammoniaque peuvent fournir des courbes d'inhibition atypiques. En conséquence, de telles courbes doivent être interprétées avec précaution.

4.

**RÉFÉRENCES**

- (1) Normes internationales ISO 8192 (1986.)
  - (2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.
  - (3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.
  - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method n° 103*, décrite aussi par :
  - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.
  - (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.
  - (7) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 209*, décision du Conseil C(81) 30 final.
-

## C. 12

### BIODÉGRADATION

#### TEST S.C.A.S. MODIFIÉ

## 1. MÉTHODE

### 1.1. Introduction

Le but de la méthode est de mesurer la biodégradabilité totale potentielle de composés organiques non volatils et solubles dans l'eau, lorsqu'ils sont exposés à des concentrations relativement élevées de micro-organismes pendant une longue période. La viabilité des micro-organismes est maintenue tout au long de cette période par un apport journalier d'eaux résiduaires décantées. (Pendant le week-end, les eaux résiduaires peuvent être stockées à 4 °C. Les eaux résiduaires synthétiques de l'essai de confirmation de l'OCDE peuvent également être utilisées.)

Une adsorption physico-chimique sur les particules solides en suspension peut se produire et doit être prise en considération lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Étant donné la longue période de rétention de la phase aqueuse (36 heures) et l'ajout régulier de substances nutritives, l'essai n'est pas une simulation des conditions rencontrées dans une station d'épuration des eaux usées. Les résultats obtenus avec diverses substances d'essai indiquent que cet essai a un potentiel élevé de biodégradation.

Les conditions dans lesquelles se déroule l'essai facilitent la sélection et/ou l'acclimatation de micro-organismes susceptibles de dégrader la solution d'essai (la procédure peut également être utilisée en vue de préparer un inoculum acclimaté pour d'autres essais).

Dans cette méthode, on mesure la concentration de carbone organique dissous (COD) pour évaluer la biodégradabilité finale des substances d'essai. Il est préférable de déterminer le COD après acidification et purge plutôt qu'en établissant la différence  $C_{\text{total}} - C_{\text{minéral}}$ .

Le recours simultané à une analyse spécifique permet de déterminer la biodégradabilité primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai:

- sont solubles dans l'eau (au moins 20 mg de COD par litre),
- ont une pression de vapeur négligeable,
- n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries,
- ne font pas l'objet d'une adsorption importante au cours de l'essai,
- ne sont pas éliminées par moussage de la solution d'essai.

La teneur en carbone organique de la substance d'essai doit être déterminée.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

Il est souhaitable de connaître le seuil de toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

### 1.2. Définitions et unités

$C_T$  = concentration de la substance d'essai en carbone organique contenu dans ou ajouté à l'effluent décanté au début de la période d'aération (mg par litre)

$C_t$  = concentration en COD du liquide surnageant de la substance d'essai à la fin de la période d'aération (mg par litre)

$C_c$  = concentration en COD du liquide surnageant du témoin à la fin de la période d'aération (mg par litre)

Dans cette méthode, la biodégradation est déterminée par la disparition du carbone organique. La dégradation biotique peut être exprimée en:

1) pourcentage d'élimination de  $D_{da}$  de l'apport journalier de la substance:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

où:

$D_{da}$  = dégradation/apport journalier;

2) pourcentage d'élimination des substances présentes en début de journée:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

où:

$D_{ssd}$  = dégradation/substance en début de journée.

Les facteurs  $i$  et  $(i+1)$  se réfèrent au jour où la mesure a été effectuée.

Il est recommandé d'utiliser l'équation 2(a) si l'effluent COD varie d'un jour à l'autre et l'équation 2(b) lorsque l'effluent COD reste relativement constant d'un jour à l'autre.

### 1.3. Substances de référence

Quand on étudie une nouvelle substance, les produits de référence peuvent parfois se révéler utiles; on ne peut cependant pas encore recommander de produits de référence particuliers.

Il est fait mention de données relatives à plusieurs composés qui ont fait l'objet d'essais d'intercomparaison (voir appendice 1), notamment pour pouvoir procéder à l'étalonnage périodique de la méthode et pour permettre de comparer des résultats obtenus par une autre méthode.

### 1.4. Principe de la méthode d'essai

Placer des boues activées provenant d'une station d'épuration des eaux usées dans une unité de traitement de boue activée à alimentation semi-continue (SCAS). Ajouter la substance d'essai et des eaux domestiques décantées et aérer le mélange pendant 23 heures. Arrêter ensuite l'aération, mettre la boue à décanter et retirer le liquide surnageant.

Puis, mélanger les boues restées dans l'aérateur à une autre partie aliquote de substance d'essai et d'eaux résiduaires et répéter le cycle.

La biodégradabilité est mesurée en déterminant la teneur en carbone organique dissous du liquide surnageant. Cette valeur est comparée à celle du liquide provenant d'un témoin alimenté uniquement avec des eaux domestiques décantées.

Lorsqu'on effectue une analyse spécifique, la modification de la concentration de la molécule mère en fonction de la biodégradabilité peut être mesurée (biodégradation primaire).

### 1.5. Critères de qualité

La reproductibilité de cette méthode basée sur l'élimination de COD n'a pas encore été établie (en ce qui concerne la biodégradation primaire, on obtient des données très précises pour les substances qui sont fortement dégradées).

La sensibilité de la méthode est en grande partie conditionnée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination de COD et par la concentration de la substance d'essai dans le liquide au début de chaque cycle.

### 1.6. Description de la méthode d'essai

#### 1.6.1. Préparations

Réunir un nombre suffisant d'unités d'aération (l'unité d'essai SCAS de 1,5 litre peut également être utilisée) et de tuyaux d'aération (figure 1) pour chaque substance d'essai et de référence.

L'air comprimé fourni aux unités d'essai, nettoyées au moyen d'un filtre de coton hydrophile, ne doit pas contenir de carbone organique et doit être saturé préalablement à l'eau pour réduire les pertes dues à l'évaporation.

Prélever un échantillon de liqueur mixte, contenant de 1 à 4 grammes de solides en suspension par litre dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux ménagères. Prévoir environ 150 ml de liqueur mixte par aérateur.

Préparer la solution mère de la substance d'essai dans de l'eau distillée; la concentration normalement requise est de 400 mg/l de carbone organique, ce qui donne une concentration en carbone de la substance d'essai de 20 mg/l au début de chaque cycle d'aération s'il n'y a pas de biodégradation.

Des concentrations plus élevées peuvent être utilisées si la toxicité vis-à-vis des micro-organismes le permet.

On mesure la teneur en carbone organique de la solution mère.

#### 1.6.2. *Mode opératoire*

L'essai doit être effectué à une température comprise entre 20 et 25 °C.

Utiliser une concentration élevée de micro-organismes aérobies (de 1 à 4 g/l de matières en suspension) et respecter une période de rétention effective de 36 heures. Largement oxyder les substances carbonées dans l'effluent d'alimentation, normalement pendant une période de 8 heures suivant le début de chaque cycle d'aération. Laisser ensuite respirer la boue en façon endogène pendant le reste de la période d'aération. Le seul substrat disponible est la substance d'essai, à moins qu'elle n'ait été également métabolisée. Ces conditions, combinées à une réinoculation journalière de l'essai lorsque des eaux domestiques sont utilisées comme milieu, sont extrêmement favorables à l'acclimatation et à une biodégradation rapide.

#### 1.6.3. *Réalisation de l'essai*

Prélever un échantillon de liqueur mixte dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux domestiques ou dans une unité de laboratoire et le maintenir en aérobiose jusqu'à son utilisation en laboratoire. Chaque aérateur ainsi que l'unité de référence sont remplis avec 150 ml (en cas d'utilisation de l'unité d'essai SCAS originelle, il faut multiplier les volumes donnés par 10) de liqueur mixte et l'aération commence. Après 23 heures, l'aération est arrêtée et on laisse reposer les boues pendant 45 minutes. Ouvrir un à un les robinets de chaque récipient et retirer 100 ml du liquide surnageant. Prélever un échantillon des eaux domestiques décantées immédiatement avant l'utilisation et ajouter 100 ml aux boues demeurant dans chaque aérateur. L'aération est répétée. À ce stade, ne plus ajouter aucune substance d'essai et alimenter journalièrement les unités avec des eaux ménagères jusqu'à l'obtention d'un liquide surnageant limpide lors de la précipitation. Cette opération prend normalement deux semaines. À ce moment, le COD dans le liquide surnageant à la fin de chaque cycle d'aération tend vers une valeur constante.

À la fin de cette période, mélanger les boues décantées individuellement et ajouter 50 ml de boues composites à chaque unité.

Ajouter 95 ml d'eaux résiduaires décantées et 5 ml d'eau aux unités de référence et 95 ml d'eaux résiduaires décantées et 5 ml de solution mère de la substance d'essai appropriée (400 mg par litre) aux unités d'essai. Procéder à une nouvelle aération pendant 23 heures. Laisser les boues décanter pendant 45 minutes, retirer le liquide surnageant et l'analyser pour déterminer sa teneur en COD.

Cette procédure de prélèvement et de remplissage décrite ci dessus est répétée tous les jours pendant la période de l'essai.

Avant la décantation, il peut s'avérer nécessaire de nettoyer les parois des unités afin d'empêcher l'accumulation de solides au-dessus du niveau du liquide. Pour nettoyer chaque unité, un hérisson ou une brosse séparée sont utilisés afin d'empêcher la contamination croisée.

Théoriquement, il faudrait déterminer journalièrement le COD dans les liquides surnageants, mais des analyses moins fréquentes sont autorisées. Avant d'être analysées, les liqueurs doivent être filtrées sur une membrane de 0,45 µm ou centrifugées. Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'absorbent pas la substance d'essai au cours de la filtration. La température de l'échantillon ne doit pas dépasser 40 °C lorsqu'il se trouve dans la centrifugeuse.

La durée de l'essai pour les composés peu ou non biodégradables est indéterminée, mais l'expérience démontre qu'il faut compter au moins 12 semaines et qu'il ne faut pas dépasser 26 semaines.

## 2. **DONNÉES ET ÉVALUATION**

La courbe de la teneur en COD des liquides surnageants des unités d'essai et des unités de référence est établie en fonction du temps.

Lorsque la biodégradation est terminée, le niveau constaté dans la substance d'essai est voisin de celui du témoin. Lorsque la différence entre ces deux niveaux ne varie plus sur trois mesures consécutives, il suffit alors d'obtenir un nombre de mesures complémentaires suffisantes pour permettre l'analyse statistique des données et de calculer le pourcentage de biodégradation de la substance d'essai ( $D_{da}$  ou  $D_{ssd}$ : voir 1.2).



### 3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

#### 3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

- toutes les informations relatives à la nature des eaux résiduaires, au type d'unité utilisé et aux résultats expérimentaux concernant la substance d'essai, à la substance de référence s'il y a lieu et au témoin,
- la température,
- la courbe de disparition avec description, mode de calcul (voir 1.2),
- la date et l'endroit du prélèvement des échantillons de boues activées et d'eaux résiduaires, le degré d'acclimatation, de concentration etc.,
- les raisons scientifiques de toute modification du mode opératoire,
- la signature et la date.

#### 3.2. Interprétation des résultats

Étant donné que, en l'occurrence, la substance d'essai n'est pas facilement biodégradable, toute disparition de COD due uniquement à la biodégradation devrait se faire graduellement sur une période de quelques jours ou de quelques semaines, sauf dans les cas où l'acclimatation est soudaine, ce qui se traduit par une brusque disparition après quelques semaines.

Toutefois, l'adsorption physico-chimique peut parfois jouer un rôle important; cela se manifeste par la disparition partielle ou complète du COD ajouté au départ. Ce qui se passe ultérieurement dépend de facteurs tels que les degrés d'adsorption et de concentration des solides en suspension dans l'effluent écarté. Généralement, la différence de concentration en COD dans les liquides surnageants d'essai et de référence augmente graduellement à partir d'une valeur initiale peu élevée et se maintient au niveau de la nouvelle valeur pour la durée restante de l'expérience, à moins qu'une acclimatation n'intervienne.

Pour distinguer la biodégradation (ou la biodégradation partielle) de l'adsorption, il faut procéder à d'autres essais. Il existe plusieurs méthodes mais la plus probante consiste à utiliser les liquides surnageants ou les boues comme inoculum dans un test du dossier de base (de préférence un test respirométrique).

Les substances d'essai faisant disparaître de grandes quantités de COD sans adsorption doivent être considérées comme potentiellement biodégradables. Une disparition partielle, qui n'est pas due à l'adsorption, indique que le produit est susceptible de se dégrader partiellement.

Des disparitions de COD peu importantes ou nulles peuvent être dues à l'inhibition de micro-organismes par des substances d'essai, ce qui peut également se traduire par lyses et perte de boues; dans ce cas, les liquides surnageants sont troubles. Le test doit alors être répété en utilisant une concentration moins élevée de substances d'essai.

L'utilisation d'une analyse spécifique ou d'une substance d'essai marquée au  $^{14}\text{C}$  peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas d'un composé d'essai marqué au  $^{14}\text{C}$ , la récupération de  $^{14}\text{CO}_2$  confirmera la biodégradation.

Lorsque les résultats sont également exprimés en termes de biodégradation primaire, il convient de donner, dans la mesure du possible, des explications sur les modifications intervenues dans les structures chimiques aboutissant au défaut de réponse de la substance d'essai mère.

La validation de l'analyse doit être indiquée avec le résultat obtenu dans le milieu de l'essai témoin.

### 4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, *Lignes directrices 302 A*, décision du Conseil C(81) 30 final.

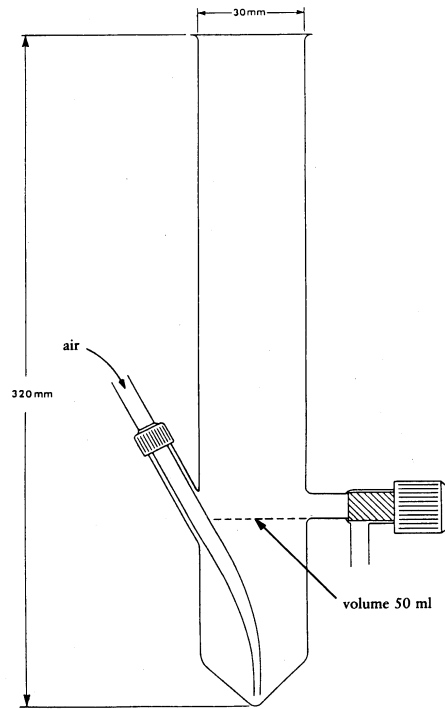
Appendice 1

Test S.C.A.S.: exemple de résultats

Substance	$C_T$ (mg/l)	$C_i - C_c$ (mg/l)	Pourcentage biodegradation $D_{da}$	Durée de l'essai (jours)
4-acétyl aminobenzène sulphonate	17,2	2,0	85	40
Tétra propylène benzène sulphonate	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophénol	16,9	0,8	95,3	40
Diéthylène glycol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentane tétra carboxylate	17,9	3,2	81,1	120

Appendice 2

Exemple d'appareil d'essai



## C.13 BIOCONCENTRATION :

### ESSAI AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU SUR LES POISSONS

#### 1. METHODE

La présente méthode de bioconcentration reproduit les directives OECD TG 305 (1996).

##### 1.1 INTRODUCTION

La présente méthode décrit une procédure de caractérisation du potentiel de bioconcentration dans le cas de poissons soumis à un renouvellement continu de certaines substances. Les régimes d'essais avec renouvellement continu seront très largement préférés, mais des régimes semi-statiques sont également acceptables dans la mesure où les critères de validité sont satisfaits.

La méthode donne toutes informations nécessaires à l'exécution de l'essai mais laisse les libertés indispensables à l'adaptation du concept expérimental aux conditions spécifiques de chaque laboratoire et n'impose pas strictement les caractéristiques des substances à tester. Elle convient particulièrement bien aux produits organiques stables dont les valeurs  $\log P_{ow}$  sont comprises entre 1,5 and 6,0 (1) mais reste applicable aux substances superlipophiles ( $\log P_{ow} > 6.0$ ). Pour ces dernières, l'estimation préalable du facteur de bioconcentration (BCF), parfois dénommé  $K_B$ , sera vraisemblablement supérieure à la valeur du facteur de bioconcentration à l'état stable ( $BCF_{ss}$ ) auquel on peut s'attendre dans une expérience de laboratoire. Les évaluations préliminaires du facteur de bioconcentration des produits organiques dont les valeurs  $\log P_{ow}$  vont jusqu'à 9,0 environ sont calculables à l'aide de l'équation de Bintein et al (2). Le potentiel de bioconcentration se caractérise par certains paramètres, dont la constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ ), la constante de vitesse d'élimination ( $k_2$ ) et le  $BCF_{ss}$ .

Les substances d'essai radiomarquées peuvent faciliter l'analyse des échantillons d'eau et de poissons et peuvent aussi servir à définir s'il est souhaitable d'identifier et quantifier la dégradation. Si les résidus radioactifs totaux sont mesurés (par exemple par combustion ou solubilisation des tissus), le BCF est basé sur le composé d'origine, tous les métabolites retenus ainsi que le carbone assimilé. Les BCF basés sur les résidus radioactifs totaux ne peuvent donc pas être directement comparables à un BCF dérivé d'une analyse chimique particulière du composé d'origine seul.

On pourra mettre en oeuvre des procédures d'assainissement dans les études radiomarquées pour déterminer le BCF sur la base du composé d'origine et les principaux métabolites seront déterminés si on le juge nécessaire. Il est possible aussi de combiner une étude du métabolisme du poisson avec une étude de bioconcentration par analyse et identification des résidus tissulaires.

##### 1.2 DEFINITIONS ET UNITES

**Bioconcentration/Bioaccumulation** : augmentation de la concentration de la substance à tester dans ou sur un organisme (des tissus spécifiques de celui-ci) par rapport à la concentration de cette substance dans le milieu ambiant.

**Facteur de bioconcentration (BCF ou  $K_B$ )** : à tout moment pendant la phase d'absorption de l'essai d'accumulation, concentration de la substance à tester dans/sur le poisson, ou des tissus déterminés de celui-ci, ( $C_f$  en  $\mu\text{g/g}$  (ppm)) divisée par la concentration de la substance chimique dans le milieu ambiant ( $C_w$  en  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)).

**Facteur de bioconcentration à l'état stable ( $BCF_{ss}$  ou  $K_B$ )** : il ne change pas notablement pendant un laps de temps prolongé, la concentration de la substance d'essai dans le milieu ambiant étant constante pendant cette même période.

**Plateau ou état stable** : sur la représentation graphique de la substance d'essai dans le poisson ( $C_f$ ) en fonction du temps, il est atteint lorsque la courbe devient parallèle à l'axe du temps et que trois analyses successives de  $C_f$  réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles de deux jours au moins restent dans une plage de  $\pm 20\%$  les unes des autres, et qu'il n'y a pas de différences significatives entre les trois périodes d'échantillonnage. Lorsqu'on analyse des échantillons mis en commun, il faut procéder à quatre analyses successives au moins. Si les substances d'essais ont des caractéristiques d'absorption lentes, on optera de préférence pour des intervalles hebdomadaires.

**Facteurs de bioconcentration** : calculés directement à partir des constantes cinétiques ( $k_1/k_2$ ) on les appelle facteurs de concentration cinétique,  $BCF_K$ .

**Coefficient de partage octanol-eau** ( $P_{ow}$ ) : rapport de la solubilité d'un produit chimique dans le n-octanol et dans l'eau, à l'équilibre (Méthode A.8), également désigné par  $K_{ow}$ . Le logarithme de  $P_{ow}$  indique le potentiel de bioconcentration d'un produit chimique par les organismes aquatiques.

**Phase d'exposition ou d'absorption** : temps pendant lequel les poissons sont exposés au produit chimique testé.

**Constante de vitesse d'absorption** ( $k_1$ ) : valeur numérique définissant la vitesse d'accroissement de la concentration dans la substance à tester dans/sur le poisson (ou des tissus spécifiques de celui-ci) lorsqu'il est exposé à ce produit chimique ( $k_1$  est exprimé en jours<sup>-1</sup>).

**Phase de post-exposition ou d'élimination (perte)** : à la suite du transfert des poissons d'un milieu contenant la substance à tester à un milieu exempt de celle-ci, temps pendant lequel l'élimination (ou perte nette) de la substance par les poissons de l'essai (ou les tissus spécifiques) est étudié.

**Constante de vitesse d'élimination (perte)** ( $k_2$ ) : valeur numérique définissant la vitesse de diminution de la concentration de la substance à tester dans les poissons de l'essai (ou les tissus spécifiques) à la suite de leur transfert d'un milieu contenant la substance à tester à un milieu qui en est exempt ( $k_2$  exprimé en jours<sup>-1</sup>).

### 1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

L'essai se décompose en deux phases : la phase d'exposition (absorption) et de post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, des groupes distincts de poissons d'une espèce sont exposés à au moins deux concentrations de la substances d'essai. Puis ils sont transférés dans un milieu exempt de cette substance, pour la phase d'élimination. Cette dernière est toujours nécessaire sauf lorsque l'absorption de la substance pendant la phase d'absorption a été insignifiante (par exemple si le BCF est inférieur à 10). La concentration de la substance à tester dans/sur le poisson (ou des tissus spécifiques) est suivie pendant les deux phases de l'essai. Outre les deux concentrations de l'essai, un groupe témoin de poissons est maintenu dans des conditions identiques hormis la substance à tester, qui est absente. Ceci pour établir les éventuelles relations entre les effets néfastes observés dans le test de bioconcentration et ce groupe témoin assorti, et déduire les concentrations de fond de la substance à tester.

La phase d'absorption dure 28 jours sauf s'il est démontré que l'équilibre a été atteint plus tôt. On peut prévoir la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire à l'obtention de l'état stable grâce à l'équation donnée en Annexe 3. La période de dépuracion commence alors par le transfert des poissons dans un autre récipient propre contenant le même milieu, exempt cette fois de la substance à tester. Lorsque cela est possible, on calcule le facteur de bioconcentration de préférence à la fois en tant que rapport ( $BCF_{ss}$ ) de concentration des poissons ( $C_f$ ) et dans l'eau ( $C_w$ ) à l'état d'équilibre apparent et en tant que facteur de bioconcentration cinétique ; et  $BCF_K$  en tant que rapport des constantes de vitesse d'absorption ( $k_1$ ) et de dépuracion ( $k_2$ ), en supposant une cinétique de premier ordre. Si, à l'évidence, on n'entre pas dans une cinétique de premier ordre, des modèles plus complexes devront être mis en oeuvre (Annex 5).

Si l'on ne parvient pas à un état stable dans les 28 jours, la phase d'absorption sera prolongée jusqu'à cet état stable, ou bien pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant ; puis commence la phase d'élimination.

La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse de dépuracion (perte) (ou les constantes, lorsque des modèles plus complexes entrent en jeu), le facteur de bioconcentration et, si possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir du modèle décrivant le plus fidèlement les mesures de concentrations de la substance à tester dans les poissons et l'eau.

Le BCF est exprimé en fonction du poids frais total du poisson. Cependant, pour certaines études, des tissus ou organes spécifiques (par ex. muscles, foie) peuvent être utilisés si les poissons sont suffisamment gros ou s'il est possible d'en séparer les parties comestibles (filets) et non comestibles (viscères). La relation claire liant le potentiel de bioconcentration et la lipophilie pour de nombreuses substances organiques, entraîne une relation correspondante entre la teneur en lipides des poissons de l'essai et les bioconcentrations observées de ces substances. Donc, pour réduire cette source de variabilité dans les résultats des essais concernant les substances à forte lipophilie (c.a.d. ayant un  $\log P_{ow} > 3$ ), la bioconcentration devrait être exprimée en fonction de la masse corporelle totale, mais aussi de la teneur lipidique.

La teneur lipidique sera établie si possible sur les mêmes matériels biologiques qui auront servi à déterminer la concentration de la substance à tester.

#### 1.4 INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Avant d'entreprendre l'essai de bioconcentration, les informations suivantes devront être réunies au sujet de la substance à tester :

- a) solubilité dans l'eau
- b) coefficient de partage octanol-eau  $P_{ow}$  (noté également  $K_{ow}$ , déterminé par une méthode HPLC en A.8)
- c) hydrolyse
- d) caractéristiques de la phototransformation dans l'eau sous rayonnement solaire ou solaire artificiel et dans les conditions de rayonnement de l'essai de bioconcentration (3)
- e) tension superficielle (c.a.d. pour les substances dont le  $\log P_{ow}$  ne peut être établi)
- f) pression de vapeur
- g) biodégradabilité dite « facile » (le cas échéant)

Il faudra aussi connaître la toxicité relative à l'espèce de poissons utilisée dans l'essai, de préférence la  $LC_{50}$  à l'asymptote (c.a.d. indépendante du temps). Il est indispensable de disposer d'une méthode analytique correcte, d'une exactitude, d'une précision et d'une sensibilité connues pour la quantification de la substance à tester dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique, ainsi que d'informations précises sur la préparation et le stockage des échantillons. Il faut aussi connaître la limite de détection analytique de la substance à tester tant dans l'eau que dans les tissus des poissons. Si une substance à tester marquée au  $^{14}C$  est utilisée, le pourcentage de radioactivité associée aux impuretés devra être connu.

#### 1.5 CONDITIONS VALIDITE DE L'ESSAI

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes devront être vérifiées:

- la variation de température est inférieure à  $\pm 2^{\circ}C$  ;
- la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas au-dessous de 60% du niveau de saturation ;
- la concentration de la substance à tester dans les enceintes est maintenue à  $\pm 20\%$  de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption ;
- la mortalité et autres effets/maladies indésirables tant parmi les poissons témoins que chez ceux traités sont inférieures à 10% à la fin de l'essai ; lorsque l'essai est prolongé sur plusieurs semaines ou mois, la mortalité ou les autres effets indésirables dans les deux ensembles de poissons devront être inférieure à 5% par mois et ne pas excéder 30% au total.

#### 1.6 COMPOSES DE REFERENCE

L'utilisation de composés de référence ayant un potentiel de bioconcentration connu pourra aider au contrôle de la procédure expérimentale, si nécessaire. On ne peut cependant encore recommander de substances spécifiques.

#### 1.7 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

##### 1.7.1 Appareillage

On prendra soin d'éviter les matériaux susceptibles de présenter un effet indésirable d'adsorption, dissolution ou lessivage sur les poissons, et ce pour toutes les pièces de l'équipement. Des réservoirs standards rectangulaires ou cylindriques, en matériaux chimiquement inertes et d'une capacité adaptée au régime de remplissage seront utilisés. On réduira au minimum l'usage de tuyaux en plastique souple. Les tubages en Téflon (R), acier inoxydable et/ou verre auront la préférence. L'expérience a montré que pour les substances présentant de forts coefficients d'adsorption, tel que les pyréthrinés de synthèse, le verre silanisé peut être nécessaire. Il faudra, dans ces cas-là, se débarrasser des équipements après usage.

## 1.7.2 Eau

On utilise généralement pour les essais une eau naturelle provenant d'une source non polluée et de qualité uniforme. L'eau de dilution doit être d'une qualité permettant la survie de l'espèce de poissons choisie, pour la durée des périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'apparaissent aucun comportement ni aspect anormaux. Dans l'idéal, il faudrait démontrer que les espèces soumises à l'essai peuvent survivre, grandir et se reproduire dans l'eau de dilution (par ex. en élevage de laboratoire ou par une étude de toxicité sur un cycle biologique). L'eau sera caractérisée au minimum selon son pH, sa dureté, ses matières solides totales, son carbone organique total et, de préférence aussi, ses teneurs ammoniacales, en nitrates et son alcalinité et, pour les espèces marines, sa salinité. On connaît parfaitement les paramètres importants du bien-être optimal chez les poissons, mais l'Annexe I indique les concentrations maximales recommandées d'un certain nombre de paramètres concernant les eaux d'essais, douces et marines.

Pendant toutes la durée d'un essai, l'eau sera d'une qualité constante. Le pH se tiendra entre 6,0 et 8,5, mais pour un essai donné il restera à l'intérieur d'une plage de  $\pm 0,5$  unités de pH. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'étude (par exemple par complexation de la substance à tester) ou n'affectera pas négativement les performances du stock de poissons, on prélèvera régulièrement des échantillons pour analyses. Il conviendra par exemple de procéder chaque trois mois, lorsqu'une eau de dilution est connue pour être relativement constante en qualité, à la détermination des métaux lourds (par ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), des anions et cations principaux (par ex. Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ) ; des pesticides (par ex. organophosphorés totaux et organochlorés totaux) ; du carbone organique total et des solides en suspension. S'il est démontré que la qualité de l'eau est constante pendant une année au moins, ces analyses pourront être moins fréquentes et leurs intervalles espacés (par ex. chaque six mois).

La teneur en particules naturelles ainsi que le carbone organique total (TOC) de l'eau de dilution seront aussi faibles que possible pour éviter l'adsorption de la substance à tester sur les matières organiques, qui pourrait réduire sa biodisponibilité (4). La valeur maximale admissible est de 5 mg/l pour les particules de matière (matière sèche ne traversant pas un filtre de 0,45 $\mu\text{m}$ ) et 2 mg/l pour le carbone organique total (voir Annexe 1). Si nécessaire, l'eau sera filtrée avant usage. La contribution des poissons de l'expérience (excréta) et des résidus alimentaires, à la teneur de l'eau en carbone organique total devra être aussi faible que possible. Tout au long de l'essai, la concentration en carbone organique dans le récipient concerné ne devra pas dépasser de plus de 10 mg/l ( $\pm 20\%$ ) celle du carbone organique provenant de la substance à tester et, le cas échéant, de l'agent de dissolution.

## 1.7.3 Solutions d'essai

On prépare une solution stock de la substance à tester, à la concentration voulue. La solution stock sera de préférence préparée par simple mélange ou agitation de la substance à tester dans l'eau de dilution. L'utilisation de solvants ou de dispersants (agents de dissolution) n'est pas recommandée ; on peut y recourir cependant dans certains cas pour produire une solution stock à la concentration nécessaire. Les solvants susceptibles d'être utilisés sont l'éthanol, le méthanol, l'éther monométhyle d'éthylène glycol, l'éther diméthyle d'éthylène glycol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Les dispersants utilisables sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01% et le HCO-40. Des précautions seront prises en cas d'utilisation d'agents facilement biodégradables, ces derniers pouvant provoquer des problèmes de croissance bactérienne dans les tests avec renouvellement continu. La substance d'essai peut être radiomarquée et devra être du plus haut niveau de pureté (par ex. de préférence  $>98\%$ ).

Pour les essais avec renouvellement continu, un appareillage apportera et diluera en permanence la solution stock de la substance à tester (par ex. pompe doseuse, dilueur proportionnel, système saturateur) pour amener les concentrations d'essai jusqu'aux enceintes. Il sera préférable de prévoir au moins cinq volumes de remplacement par jour pour chaque enceinte d'essai. Le mode avec renouvellement continu sera préféré, mais en cas d'impossibilité (par ex. lorsque les organismes de l'essai subissent des effets néfastes) une technique semi-statique pourra être mise en oeuvre si les critères de validité restent satisfaits. Les régimes d'écoulement des solutions stocks et de l'eau de dilution seront contrôlés 48 heures avant l'essai puis au moins quotidiennement pendant celui-ci. Ce contrôle comportera la détermination du débit dans chaque enceinte d'essai et l'on s'assurera qu'il ne s'écarte pas de plus de 20% pour chacune d'elles ou bien entre elles et les autres.

## 1.7.4 Sélection des espèces

Parmi les critères importants de sélection des espèces figurent la facilité de se les procurer, leur taille, et la possibilité d'un entretien aisé en laboratoire. On sélectionnera aussi les espèces de poissons en fonction de leur importance en matière de loisirs, commerce ou écologie ; ils doivent également être de sensibilités comparables, avoir produit de bons résultats dans le passé, etc.

On trouvera en Annexe 2 une liste d'espèces recommandées pour les essais. D'autres espèces peuvent être utilisées mais la procédure d'essai peut devoir être adaptée pour établir des conditions expérimentales convenables. Dans un tel cas, on exposera les motivations du choix des espèces et la méthode expérimentale retenue.

### **1.7.5 Conservation des poissons**

Il faut acclimater la population de poissons pendant deux semaines au moins dans une eau à la température de l'essai et apporter une quantité de nourriture suffisante et du même type que celle qui sera utilisée pendant l'essai.

Après une période d'installation de 48 heures, on enregistre les taux de mortalité et les critères suivants sont appliqués :

- mortalité supérieure à 10% de la population en sept jours : rejeter le lot entier ;
- mortalité entre 5 et 10% de la population en sept jours : prolonger l'acclimatation pendant sept jours de plus ;
- mortalité inférieure à 5% de la population en sept jours : accepter le lot - si la mortalité dépasse 5% pendant les sept jours suivants, rejeter le lot entier.

S'assurer que les poissons utilisés pour les essais ne présentent pas de maladies ni d'anomalies observables. Écarter tout poisson malade. Les poissons ne sont pas censés être traités contre une quelconque maladie pendant les deux semaines précédant l'essai, ni pendant celui-ci.

## **1.8 EXECUTION DE L'ESSAI**

### **1.8.1 Essai préliminaire**

Il peut être utile de procéder à une expérimentation préliminaire pour optimiser les conditions d'exécution de l'essai réel, en ce qui concerne par ex. la sélection de la/des concentration(s) de la substance à tester, la durée des phases d'absorption et d'élimination.

### **1.8.2 Conditions d'exposition**

#### *1.8.2.1 Durée de la phase d'absorption*

On peut prévoir la durée de la phase d'absorption en s'appuyant sur une expérience concrète (par ex. à partir d'une étude antérieure ou d'un produit chimique ayant des propriétés d'accumulation) ou à partir de certaines relations empiriques fondées sur ce que l'on sait de la solubilité dans l'eau ou bien du coefficient de partage octanol/eau de la substance à tester (voir Annexe 3).

La phase d'absorption durera 28 jours sauf s'il peut être démontré qu'un équilibre a été atteint plus tôt. Si l'on ne parvient pas à un état stable dans les 28 jours, la phase d'équilibre sera prolongée et l'on procédera à d'autres mesures, jusqu'à état stable ou pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant.

#### *1.8.2.2 Durée de la phase d'élimination*

La moitié de la durée de la phase d'absorption convient généralement pour que se produise une réduction convenable (par ex. 95%) de la charge corporelle en substance d'essai (voir explications de l'estimation en Annexe 3). Si le temps nécessaire pour parvenir à une perte de 95% est démesurément long, dépassant par exemple de deux fois la durée normale de la phase d'absorption (à savoir plus de 56 jours), on pourra en rester à une période plus courte (c.a.d. jusqu'à ce que la concentration de la substance à tester soit inférieure à 10% de la concentration d'état stable). Cependant, pour les substances ayant des schémas d'absorption et d'élimination plus complexes que le modèle de poissons à compartiment unique, donnant une cinétique de premier ordre, on autorisera des phases de dépuración plus longues pour déterminer les constantes de vitesse d'élimination. Ce laps de temps peut néanmoins être régi par la période durant laquelle la concentration dans les poissons de la substance à tester demeure au-dessus de la limite de détection analytique.

#### *1.8.2.3 Nombre de poissons de l'essai*

Choisir les nombres de poissons par concentrations d'essai de telle sorte qu'au minimum quatre poissons par échantillon seront disponibles à chaque échantillonnage. Si l'on souhaite une statistique plus fine, le nombre de poissons par échantillons devra augmenter.

Si on utilise des poissons adultes, indiquer s'ils sont mâles ou femelles ou si les deux sexes servent à l'expérience. Dans ce dernier cas, avant de commencer l'exposition, il faudra vérifier que les différences de teneurs lipidiques ne sont pas significatives ; il pourra être nécessaire de faire des lots distincts de mâles et de femelles.

Tous les essais se feront avec un choix de poissons de poids similaires, de sorte que les plus petits ne soient pas inférieurs aux deux-tiers du poids des plus gros. Ils appartiendront tous à la même classe d'âge et proviendront de la même source. Le poids et l'âge d'un poisson ayant apparemment parfois des effets notables sur les valeurs BCF (1), ces informations seront enregistrées avec précision. Il est souhaitable qu'un sous-échantillon de la population de poissons soit pesé avant l'essai, pour en estimer le poids moyen.

#### 1.8.2.4 *Chargement*

Les rapports eau/poissons seront élevés afin de minimiser la réduction du  $C_w$  due à l'ajout des poissons au début de l'essai, mais aussi pour éviter les diminutions de concentration en oxygène dissous. Il importe que le régime de chargement soit adapté à l'espèce utilisée pour l'essai. Un régime de chargement de 0,1-1,0 g de poisson (poids humide) par litre d'eau et par jour est recommandé en tout état de cause. On peut réaliser des chargements à hauts régimes s'il est démontré que la concentration voulue en substance à tester est maîtrisable dans des limites de  $\pm 20\%$ , et que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas au-dessous de 60% du niveau de saturation.

On tiendra compte de l'habitat normal de l'espèce dans le choix du régime de chargement. Les poissons benthiques par exemple peuvent demander un aquarium ayant davantage de surface de fond que les espèces pélagiques, pour un même volume d'eau.

#### 1.8.2.5 *Alimentation*

Pendant les périodes d'alimentation et d'essai, les poissons sont nourris selon un régime approprié ayant des teneurs en lipides et protéines totales déterminées, en quantités suffisantes pour les maintenir en bonne santé et conserver leur poids corporel. Les poissons sont nourris quotidiennement pendant les périodes d'acclimatation et d'essai à raison d'environ 1 à 2% de leur poids corporel chaque jour ; on maintient ainsi pour la plupart des espèces une concentration lipidique d'un niveau relativement constant pendant l'essai. La quantité de nourriture devra être recalculée une fois par semaine par exemple, afin de maintenir un poids corporel et des teneurs lipidiques cohérents. Pour ce calcul, le poids des poissons de chaque enceinte d'essai sera estimé à partir du poids des poissons échantillonnés le plus récemment dans cette enceinte. Ne pas peser les poissons restant dans l'enceinte.

La nourriture non consommée et les excréments sont évacués par siphonnage quotidien des enceintes d'essai peu après le nourrissage (30 minutes à une heure). Les enceintes seront tenues aussi propres que possible tout au long de l'essai de sorte que la concentration de matière organique reste au plus bas niveau envisageable, car la présence de carbone organique peut limiter la biodisponibilité de la substance à tester. (1)

Nombre d'aliments étant des dérivés de farines de poissons, ils seront analysés pour déterminer leur teneur en substance d'essai. Il est préférable aussi d'analyser les teneurs de ces nourritures en pesticides et métaux lourds.

#### 1.8.2.6 *Éclairage et température*

La photo période est généralement de 12 à 16 heures et la température ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) correspondra à l'espèce utilisée. (voir Annexe 2). Le type et les caractéristiques de l'éclairage seront nettement définis. Il faudra prendre garde aux phototransformations éventuelles de la substance à tester dans les conditions de rayonnement de l'étude. L'éclairage ne devra pas exposer les poissons à des photoproduits non naturels. Dans certains cas, il peut être essentiel d'utiliser un filtre pour bloquer les rayons UV inférieurs à 290 nm.

#### 1.8.2.7 *Concentrations de l'essai*

Les poissons sont exposés à un renouvellement continu de deux concentrations aqueuses au moins de la substance à tester. Normalement, la concentration haute (ou la plus haute) de la substance à tester sera d'environ 1% de sa  $LC_{50}$  aiguë à l'asymptote, et au moins 10 fois supérieure à sa limite de détection dans l'eau par la méthode d'analyse retenue.



La plus forte concentration de l'essai peut aussi être établie en divisant la  $LC_{50}$  à 96 heures par un ratio approprié aigu/chronique (les ratios adéquats de certains produits chimiques peuvent aller de 3 à 100). Si possible, choisir l'autre (les autres) concentration(s) de sorte que la différence avec celle qui lui est supérieure atteigne un facteur dix. En cas d'impossibilité due au critère de 1% de la  $LC_{50}$  et de la limite analytique, un facteur inférieur à dix pourra être utilisé ou bien on songera à l'intervention d'une substance radiomarquée au  $^{14}C$ . Aucune concentration mise en oeuvre ne devrait dépasser la solubilité de la substance d'essai.

Lorsqu'un agent de dissolution est utilisé sa concentration ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients de l'essai. Sa contribution, ajoutée à celle de la substance à tester, à la teneur globale en carbone organique dans l'eau de l'expérience doivent être connues. Tout sera néanmoins fait pour éviter le recours à ce type de matériels.

#### 1.8.2.8 *Témoins*

Une eau de dilution témoin ou, si nécessaire, un témoin contenant l'agent de dissolution sera disponible en marge de la série des tests, dans la mesure où il a été établi que l'agent n'a aucun effet sur les poissons. Dans le cas contraire, on mettra en place les deux témoins.

### 1.8.3 **Fréquence des mesures de la qualité de l'eau**

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le TOC, le pH et la température seront mesurés dans tous les récipients. La dureté totale, et la salinité éventuellement, seront mesurées dans les témoins et un récipient contenant la concentration haute (la plus haute). Au minimum, l'oxygène dissous et éventuellement la salinité seront mesurés trois fois - au début, vers le milieu et à la fin de la période d'absorption - et une fois par semaine pendant la période d'élimination. Le TOC sera mesuré au début de l'essai (24 et 48 heures avant le démarrage de la phase d'absorption), avant l'ajout des poissons et au moins une fois par semaine pendant les périodes d'absorption et d'élimination. La température sera mesurée quotidiennement, le pH au début et à la fin de chaque période et la dureté une fois pour chaque essai. La température sera de préférence surveillée en continu dans un récipient au moins.

### 1.8.4 **Échantillonnage et analyse des poissons et de l'eau**

#### 1.8.4.1 *Calendrier d'échantillonnage des poissons et de l'eau*

De l'eau sera prélevée dans les enceintes d'essai pour établir la concentration de la substance à tester avant l'ajout des poissons et pendant les phases d'absorption et de dépuración. Au minimum, l'eau est prélevée en même temps que les poissons et avant leur alimentation. Pendant la phase d'absorption, les concentrations de substance à tester sont déterminées pour vérifier qu'elles satisfont aux critères de validité.

Les poissons sont échantillonnés en cinq occasions au moins pendant la phase d'absorption et en quatre occasions au moins pendant la phase de dépuración. Il est parfois difficile de calculer une valeur estimative raisonnablement précise du BCF sur la base de ce nombre d'échantillons, en particulier lorsque l'on sort du cadre d'une simple cinétique de dépuración de premier ordre. Dans ce cas, on pourra alors échantillonner à des rythmes plus rapides dans les deux périodes (voir Annexe 4). Les échantillons supplémentaires sont stockés et analysés uniquement si les résultats de la première série d'analyses se révèlent insuffisants au calcul du BCF avec la précision voulue.

On trouvera en Annexe 4 un exemple de calendrier d'échantillonnage acceptable. D'autres peuvent être facilement établis sur la base d'autres valeurs supposées du  $P_{ow}$  pour calculer le temps d'exposition correspondant à une absorption de 95%.

On poursuit l'échantillonnage pendant la phase d'absorption jusqu'à établissement d'un état stable ou pendant 28 jours, l'alternative la plus courte prévalant. Si l'on ne parvient pas à un état stable en 28 jours, l'échantillonnage continue jusqu'à obtention d'un état stable ou pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant. Avant de commencer la phase d'élimination, les poissons sont transférés dans des réservoirs propres.

#### 1.8.4.2 *Échantillonnage et préparation des échantillons*

On prélève les échantillons d'eau destinés aux analyses, par exemple en siphonnant à l'aide d'un tube inerte un point central de l'enceinte d'essai. Puisqu'il semble que l'on ne peut séparer ni par centrifugation ni par filtration la fraction non biodisponible de la substance à tester de celle qui est biodisponible (en particulier dans le cas des produits chimiques super-lipophiles, c.a.d. ceux ayant un  $\log P_{ow} > 5$ ) (1) (5), on peut s'abstenir de soumettre les échantillons à ces traitements.

Par contre, il faudra veiller à ce que les réservoirs restent aussi propres que possible et à ce que la teneur en carbone organique total soit surveillée tout au long des phases d'absorption et d'élimination.

Un nombre convenable de poissons (normalement quatre au minimum) est prélevé dans chaque enceinte d'essai pour chaque échantillonnage. Les poissons prélevés sont rapidement rincés à l'eau, séchés avec un papier absorbant, et sacrifiés instantanément de la manière la plus humaine possible, puis pesés.

Il est préférable d'analyser les poissons et l'eau immédiatement après l'échantillonnage pour éviter toute dégradation ou autres pertes et pour calculer approximativement les régimes d'absorption et de dépuración pendant que l'essai se poursuit. L'analyse immédiate évite aussi de ne pas retarder le constat qu'un plateau a été atteint.

Faute d'une analyse immédiate, les échantillons sont conservés selon une méthode convenable. Avant le début de l'étude, on réunira toutes informations sur la méthode de stockage adéquate de cette substance à tester, par exemple congélation, maintien à 4 °C, durée du stockage, extraction, etc.

#### 1.8.4.3 *Qualité de la méthode analytique*

L'intégralité de la procédure étant régie principalement par l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique mise en oeuvre pour la substance à tester, il faut contrôler expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance à tester tant dans l'eau que dans les poissons donnent toute satisfaction dans le cadre particulier de cette méthode. Vérifier aussi que la substance à tester n'est pas détectable dans l'eau de dilution utilisée.

Si nécessaire, les valeurs de  $C_w$  et  $C_f$  dérivées des essais seront corrigées au vu des valeurs fournies par les témoins et la concentration naturelle de la substance d'essai. Les échantillons de poissons et d'eau sont manipulés en permanence de manière à minimiser les pollutions et les pertes (résultant par ex. de l'adsorption par le matériel d'échantillonnage).

#### 1.8.4.4 *Analyse des poissons échantillonnés*

Si l'on utilise pour l'essai des matériels radiomarqués, on peut analyser le marquage radioactif total (c.a.d. composés d'origine et métabolites) ou purifier les échantillons de sorte que le composé d'origine puisse être analysé séparément. En outre, les principaux métabolites peuvent être caractérisés soit à l'état stable soit à la fin de la phase d'absorption, l'alternative la plus courte prévalant. Si le BCF en termes de résidus radiomarqués totaux est  $\geq 1000\%$ , il peut être conseillé (et, pour certaines catégories de produits chimiques tels que les pesticides, fortement recommandé), d'identifier et quantifier les produits de dégradation représentant  $\geq 10\%$  des résidus totaux dans les tissus des poissons à l'état stable. Si ces produits représentant  $\geq 10\%$  des résidus totaux radiomarqués dans les tissus de poissons sont identifiés et quantifiés, il est alors recommandé de les identifier et les quantifier aussi dans l'eau de l'essai.

La concentration de la substance à tester devrait généralement être déterminée pour chaque poisson pesé. Si cela n'est pas possible, on pourra mettre en commun les échantillons à chaque échantillonnage, mais cette mise en commun restreint véritablement les procédures statistiques dont les données pourraient bénéficier. Si une procédure et une finesse statistiques spécifiques sont souhaitées, il conviendra alors de faire participer à l'essai un nombre adéquat de poissons pour satisfaire à la procédure de regroupement et à la précision statistique désirées. (6) (7).

Le BCF sera exprimé à la fois en fonction du poids frais total et, pour les substance fortement lipophiles, en fonction de la teneur lipidique. La teneur lipidique des poissons est établie si possible lors de chaque échantillonnage. Des méthodes bien adaptées seront utilisées pour déterminer la teneur en lipides (réf. 8 et 2 de l'Annexe 3). On recommande les techniques d'extraction par chloroforme/méthanol comme méthode standard. (9). Toutes les méthodes ne donnant pas des valeurs identiques (10), il importe de bien préciser celle utilisée. L'analyse des lipides sera si possible faite sur les mêmes extraits que ceux consacrés à l'analyse de la substance à tester, puisque les lipides doivent souvent être enlevés de l'extrait avant qu'on puisse l'analyser par chromatographie. La teneur lipidique des poissons (en mg/kg de poids frais) à la fin de l'expérience ne devrait pas s'écarter de celle du début de  $\pm 25\%$ . Le pourcentage de solides dans les tissus sera lui aussi indiqué pour permettre la conversion de la concentration lipidique de la base humide à la base sèche.

## 2. DONNEES

### 2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

La courbe d'absorption de la substance à tester résultera du tracé de sa concentration, en fonction du temps, dans/sur les poissons (ou des tissus spécifiques) pendant la phase d'absorption, sur une échelle arithmétique. Si la courbe a atteint un plateau, c'est à dire adopte approximativement un tracé asymptotique à l'axe du temps, l'état stable  $BCF_{ss}$  sera calculé comme suit :

$$\frac{C_f \text{ état stable (médian)}}{C_w \text{ état stable (médian)}}$$

Lorsqu'on ne parvient à aucun état stable, il reste possible de calculer un  $BCF_{ss}$  d'une précision suffisante pour l'évaluation des risques à partir d'un "état stable" à 80% ( $1,6/k_2$ ) ou 95% ( $3,0/k_2$ ) de l'équilibre

En outre, le facteur de concentration ( $BCF_K$ ) sera défini comme le rapport  $k_1/k_2$ , des deux constantes cinétiques de premier ordre. La constante de vitesse d'élimination ( $k_2$ ) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c.a.d. un tracé de la décroissance en fonction du temps de la concentration de la substance à tester dans le poisson). La constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ ) est alors calculée en fonction de  $k_2$  et d'une valeur de  $C_f$  dérivée de la courbe d'absorption (voir aussi Annexe 5). La méthode de choix pour obtenir  $BCF_K$  et les constantes de vitesse  $k_1$  et  $k_2$ , est de recourir à des méthodes informatiques non linéaires d'estimation des paramètres (11). On peut alternativement utiliser des méthodes graphiques pour calculer  $k_1$  et  $k_2$ . Si la courbe de dépuratation est à l'évidence autre que de premier ordre, alors il conviendra d'utiliser des modèles plus complexes (voir références en Annexe 3) et de demander conseil à un biostatisticien.

### 2.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats seront interprétés avec précaution lorsque les concentrations de solution d'essai mesurées se trouvent à des niveaux proches de la limite de détection de la méthode d'analyse.

La clarté de définition des courbes d'absorption et d'élimination témoigne de la bonne qualité des données de bioconcentration. La variation des constantes absorption/élimination entre les deux concentrations d'essai doit être inférieure à 20%. Les différences notables observées dans les taux d'absorption/élimination entre les deux essais de concentration seront enregistrées et expliquées si possible. En général, la limite de confiance des BCF approche  $\pm 20\%$  dans les études bien conçues.

## 3. RAPPORT

Le procès-verbal d'essai doit comporter les informations suivantes :

### 3.1 SUBSTANCE D'ESSAI :

- nature physique et, le cas échéant, propriétés physico-chimiques :
- données d'identification chimique (y compris la teneur en carbone organique, si besoin);
- en cas de marquage radioactif, position précise du/des atome(s) marqué(s) et pourcentage de radioactivité associée aux impuretés.

### 3.2 ESPECES UTILISEES

- Dénomination scientifique, souche, source, tout traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, gamme des tailles, etc.

### 3.3 CONDITIONS DE L'ESSAI:

- procédure mise en oeuvre (par ex. renouvellement continu ou semi-statique);
- type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s);

- concept de l'essai (par ex. nombre et taille des enceintes d'essai, régime de remplacement des volumes d'eau, nombre de sous-échantillons et de poissons par sous-échantillon, nombre de concentrations testées, durée des phases d'absorption et de dépuración, fréquence des échantillonnages pour les poissons et l'eau);
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent de dissolution, sa concentration et sa contribution à la teneur en carbone organique de l'eau de l'essai seront indiqués, le cas échéant) ;
- les concentrations d'essai nominales, les moyennes des valeurs mesurées et leurs écarts-types dans les récipients d'essai et leur méthode d'obtention ;
- source de l'eau de dilution, description de tout traitement préalable, résultats de toute démonstration de l'aptitude des poissons utilisés à vivre dans cette eau et caractéristiques de celle-ci : pH, dureté, température, concentration en oxygène dissous, niveaux de chlore résiduel (si mesuré) carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (le cas échéant) et toutes autres mesures réalisées ;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, TOC, température et concentration en oxygène dissous;
- renseignements précis sur l'alimentation (par ex. type de nourriture, source, composition - au moins teneurs en lipides et protéines si possible, quantité donnée et fréquence) ;
- renseignements sur le traitement des poissons et de l'eau échantillonnés, y compris détails de préparation, stockage, extraction, procédures (et précision) de l'analyse de la substance à tester et teneur en lipides (si mesurée).

#### 3.4 RESULTATS :

- résultats de toute étude préliminaire effectuée ;
- mortalité des poissons témoins et des poissons dans chaque enceinte d'essai et tous comportements anormaux observés ;
- teneur lipidique des poissons (si détermination à l'occasion de l'essai)
- courbes (dont toutes données mesurées) montrant l'absorption et l'élimination des produits chimiques de l'essai dans les poissons, le temps d'accès à l'état stable ;
- $C_f$  et  $C_w$  (avec écart-type et plage, le cas échéant) au moment de chaque échantillonnage ( $C_f$  exprimé en  $\mu\text{g/g}$  de poids frais (ppm) de tout l'animal ou de certains de ses tissus, par ex. lipides et  $C_w$  en  $\mu\text{g/ml}$  (ppm). Valeurs  $C_w$  de la série témoin (indiquer aussi la concentration de fond) ;
- facteur de bioconcentration à l'état stable ( $BCF_{ss}$ ) et/ou facteur de concentration cinétique ( $BCF_K$ ) et, le cas échéant, limites de confiance à 95% des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (perte) toutes exprimées par rapport au corps entier et de la teneur totale en lipide, si elle est mesurée, de l'animal (ou certains de ses tissus), limites de confiance et écart-type (si disponible), méthodes de calcul/analyse des données pour chaque concentration de substance d'essai utilisée ;
- lorsqu'on utilise des substances radiomarquée, l'accumulation de tous les métabolites détectés pourra être signalée si cela est nécessaire,;
- toute situation inhabituelle concernant l'essai, tout écart de ces procédures et toutes autres informations pertinentes.

Minimiser les résultats du type "non détecté à la limite de détection" par la mise en place d'une méthode d'essai préliminaire et l'élaboration d'un concept expérimental, car ces résultats sont inutilisables pour les calculs des constantes de vitesse.

**REFERENCES**

- 1) **Connell** D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, pp 117-156.
- 2) **Bintein** S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, **1**, 29-39.
- 3) **OECD**, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) **Kristensen** P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) **US EPA** 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) **US FDA**, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) **Compaan** H. (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.
- 9) **Gardner** et al, (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) **Randall** R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* **10**, pp 1431-1436.
- 11) **CEC**, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM** E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

**ANNEXE 1**

**CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES ACCEPTABLES POUR L'EAU DE DILUTION**

	<b>SUBSTANCE</b>	<b>LIMITE DE CONCENTRATION</b>
1	Particules de matière	5 mg/l
2	Carbone organique total	2 mg/l
3	Ammoniaque non-ionisé	1 µg/l
4	Chlore résiduel	10 µg/l
5	Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/l
6	Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles	50 ng/l
7	Chlore organique total	25 ng/l
8	Aluminium	1µg/l
9	Arsenic	1µg/l
10	Chrome	1µg/l
11	Cobalt	1µg/l
12	Cuivre	1µg/l
13	Fer	1µg/l
14	Plomb	1µg/l
15	Nickel	1µg/l
16	Zinc	1µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Mercure	100 ng/l
19	Argent	100 ng/l

## ANNEXE 2

### ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR LES ESSAIS

	Espèces recommandées	Plages de températures recommandées pour les essais (°C)	Longueur totale recommandée des animaux utilisés (cm)
1	<b>Danio rerio</b> <sup>(1)</sup> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Petit Danio	20 - 25	3.0 ± 0.5
2	<b>Pimephales promelas</b> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête de boule	20 - 25	5.0 ± 2.0
3	<b>Cyprinus carpio</b> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpe	20 - 25	5.0 ± 3.0
4	<b>Oryzias latipes</b> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel)	20 - 25	4.0 ± 1.0
5	<b>Poecilia reticulata</b> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 - 25	3.0 ± 1.0
6	<b>Lepomis macrochirus</b> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Crapet arlequin	20 - 25	5.0 ± 2.0
7	<b>Oncorhynchus mykiss</b> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Truite de Kamloops	13 - 17	8.0 ± 4.0
8	<b>Gasterosteus aculeatus</b> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Épinoche épineuse	18 - 20	3.0 ± 1.0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

Diverses espèces d'estuaires et marines ont été utilisées dans certains pays par exemple :

Tambour croca	<u><i>Leiostomus xanthurus</i></u>
Pétote	<u><i>odon variegatus</i></u>
Siouclet	<u><i>Menidia beryllina</i></u>
Perche-méné	<u><i>Cymatogaster aggregata</i></u>
Carlottin anglais	<u><i>Parophrys vetulus</i></u>
Chabot	<u><i>Leptocottus armatus</i></u>
Épinoche épineuse	<u><i>Gasterosteus aculeatus</i></u>
Bar	<u><i>Dicentracus labrax</i></u>
Ablette	<u><i>Alburnus alburnus</i></u>

### **RÉCOLTE**

Les poissons d'eau douce énumérés dans le tableau ci-dessus sont faciles à élever et/ou largement disponibles tout au long de l'année, alors que la disponibilité des espèces marines ou d'estuaires est en partie limitée à certains pays. Ils peuvent se reproduire et vivre soit dans des fermes piscicoles soit en laboratoire, dans des conditions où les maladies et parasites sont sous contrôle ; les animaux utilisés seront donc sains et de lignées connues. On les trouve à peu près partout dans le monde.

### ANNEXE 3

#### PRÉVISION DE LA DURÉE DES PHASES D'ABSORPTION ET D'ÉLIMINATION

##### 1. Prévision de la durée de la phase d'absorption

Avant d'exécuter l'essai, on pourra estimer  $k_2$  et donc un pourcentage du temps nécessaire pour parvenir à l'état stable, à partir de relations empiriques entre  $k_2$  et le coefficient de partage n-octanol/eau ( $P_{ow}$ ) ou  $k_2$  et la solubilité dans l'eau (s).

On estimera  $k_2$  (jour<sup>-1</sup>) à partir, par exemple, de la relation empirique suivante (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 (r^2=0,95) \quad [\text{équation 1}]$$

Pour les autres relations, voir Réf. (2).

Si le coefficient de partage ( $P_{ow}$ ) est inconnu, on procédera à une estimation (3) à partir de la solubilité dans l'eau (s) de la substance d'après :

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 (r^2 = 0,994) \quad [\text{équation 2}]$$

où s = solubilité (moles/l) : (n=36)

Ces relations ne s'appliquent qu'aux produits chimiques dont les valeurs  $\log P_{ow}$  se situent entre 2 and 6,5 (4).

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stable résultera de l'équation cinétique générale illustrant l'absorption et l'élimination (cinétique de premier ordre), par application du  $k_2$  estimé, :

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

où, si  $C_w$  est constant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{équation 3}]$$

Lorsque l'on se rapproche de l'état stable ( $t \rightarrow \infty$ ), l'équation 3 se réduit (5) (6) à :

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{ou} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

Le rapport  $k_1 / k_2 \cdot C_w$  approche alors la concentration dans le poisson à "l'état stable" ( $C_{f,s}$ ).

L'équation 3 peut être ainsi transcrite :

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{ou} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{équation 4}]$$

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stable peut être prévu grâce à l'équation 4 lorsque  $k_2$  est estimé au préalable à l'aide des équations 1 ou 2.

À titre indicatif, la durée optimale statistique de la phase d'absorption permettant d'obtenir des données statistiquement acceptables ( $\text{BCF}_K$ ) est la période nécessaire pour que la courbe du logarithme de la concentration de la substance à tester dans le poisson, portée en temps linéaire, parvienne à son point médian, soit à  $1,6/k_2$ , ou à 80% de l'état stable, mais ne dépasse pas  $3,0/k_2$  ou 95% de l'état stable (7).



Le temps d'accession à 80% de l'état stable est (équation 4) :

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{ou} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{équation 5}]$$

De même, pour 95% de l'état stable :  $t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$  [équation 6]

Par exemple, la durée de la phase d'absorption (abs.) d'une substance à tester ayant un  $\log P_{ow} = 4$  serait (avec les équations 1, 5 et 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ jours}^{-1}$$

abs. (80%) =  $1,6/0,652$ , c.a.d. 2,45 jours (59 heures)  
ou abs. (95%) =  $3,0/0,652$ , c.a.d. 4,60 jours (110 heures)

De même, pour une substance à tester avec  $s = 10^{-5}$  mol/l ( $\log(s) = -5,0$ ), la durée de l'absorption serait (équations 1, 2, 5 et 6):

$$\begin{aligned} \log_{10}(P_{ow}) &= -0,862(-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} K_2 &= -0,414(5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ jours}^{-1} \\ \text{abs. (80\%)} &= 1,6/0,246, \text{ c.a.d. } 6,5 \text{ jours (156 heures)} \\ \text{ou abs. (95\%)} &= 3,0/0,246, \text{ c.a.d. } 12,2 \text{ jours (293 heures)} \end{aligned}$$

On utilisera aussi, à titre d'alternative, l'expression :

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (heures)}$$

pour calculer le temps d'accession effective à l'état stable (4).

## 2. Prévision de la durée de la phase d'élimination

On pourra également prévoir le temps nécessaire pour que la charge corporelle se réduise à un certain pourcentage de la concentration initiale grâce à l'équation générale illustrant l'absorption et l'élimination (cinétique de premier ordre) (1) (8).

Pour la phase d'élimination,  $C_w$  est supposé nul. L'équation peut être réduite à :

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{ou} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

où  $C_{f,o}$  est la concentration au début de la période d'élimination. On parviendra ensuite à une élimination de 50% à l'instant ( $t_{50}$ ) :

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{ou} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

De même, 95% d'élimination seront atteints à :

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Si l'on se place à 80% de l'absorption pour la première période ( $1,6/k_2$ ) et 95% de perte dans la phase d'élimination ( $3,0/k_2$ ), alors la phase d'élimination est approximativement le double de la durée de la phase d'absorption.

Il importe cependant de noter que ces estimations sont fondées sur l'hypothèse que les schémas d'absorption et d'élimination suivent une cinétique de premier ordre. Si l'on n'est pas, à l'évidence, dans ce cadre, des modèles plus complexes devront être employés (par ex. réf (1)).

### **BIBLIOGRAPHIE (de l'Annexe 3)**

- 1) **Spacie** A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, pp 309-320.
- 2) **Kristensen** P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) **Chiou** C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16** (1), pp 4-10.
- 4) **Hawker** D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), pp 701-707.
- 5) **Branson** D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, **104** (4), pp 785-792.
- 6) **Ernst** W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly** P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* **55**, pp 614-622.
- 8) **Könemann** H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, pp 3-19.

## ANNEXE 4

### EXEMPLES THEORIQUES DE CALENDRIERS D'ECHANTILLONNAGE

POUR LES TESTS DE BIOCONCENTRATION DES SUBSTANCES AYANT UN  $\log P_{ow} = 4$ .

Prélèvements de poissons	Calendrier d'échantillonnage		Nombre d'échantillons d'eau	Nombre de poissons par échantillon
	Fréquence minimale requise (jours)	Échantillonnages supplémentaires		
<b>Phase d'absorption</b>	-1 0		2* 2	ajouter 45-80 poissons
1er	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2ème	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3ème	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4ème	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5ème	4,7		2	6
<b>Phase de dépuración</b>				<b>Transférer les poissons dans une eau exempte du produit à tester</b>
6ème	5,0	5,3		4 (4)
7ème	5,9	7,0		4 (4)
8ème	9,3	11,2		4 (4)
9ème	14,0	17,5		6 (4)

\* Prélever l'eau après apport de 3 "volumes d'enceintes" au moins.

Les valeurs entre parenthèses sont les nombres d'échantillons (eau, poissons) à prélever si l'on procède à un échantillonnage supplémentaire.

Note: L'estimation avant essai de  $k_2$  pour un  $\log P_{ow}$  de 4,0 est de 0,652 jour<sup>-1</sup>. La durée totale de l'expérience est fixée à :

3 x abs. = 3 x 4,6 jours, soit 14 jours. Se reporter à l'Annexe 3 pour l'estimation de l' "abs."

## ANNEXE 5

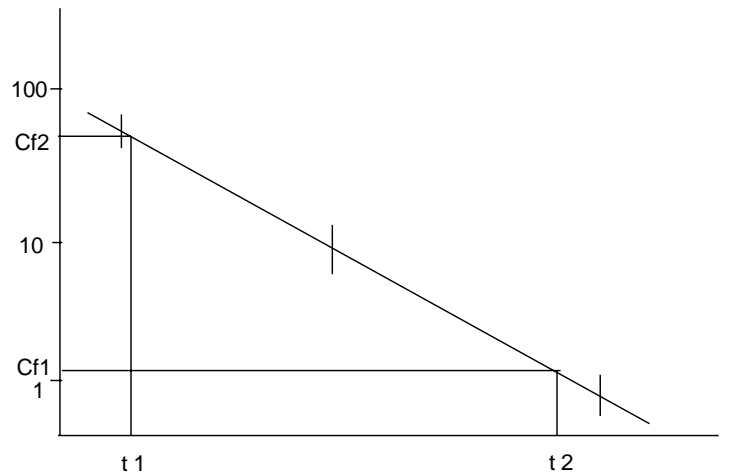
### DISCRIMINATION DES MODÈLES

On suppose que la plupart des données de bioconcentration sont "raisonnablement" bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres, selon la courbe rectiligne qui reprend approximativement les points de mesure des concentrations dans les poissons pendant la phase d'élimination, sur papier semilogarithmique. (Lorsque ces points ne peuvent se ramener à une droite, il convient de recourir à des modèles plus complexes, voir par ex. Spacie and Hamelink, Réf 1 à l'Annexe 3).

### MÉTHODE GRAPHIQUE DE DÉTERMINATION DE LA CONSTANTE DE VITESSE D'ÉLIMINATION (PERTE) $k_2$

Porter sur du papier semilogarithmique la concentration de la substance à tester trouvée dans chaque échantillon de poisson, selon le calendrier d'échantillonnage. La pente de cette droite est  $k_2$ .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Attention : les écarts par rapport à cette ligne droite peuvent indiquer un schéma d'élimination plus complexe qu'une cinétique de premier ordre. Une méthode graphique peut résoudre des types d'élimination s'écartant de la cinétique de premier ordre.

### MÉTHODE GRAPHIQUE DE DÉTERMINATION DE LA CONSTANTE DE VITESSE D'ABSORPTION $k_1$

$K_2$ , étant établi, on calcule  $k_1$  comme suit :

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \text{ [équation 1]}$$

On lit la valeur de  $C_f$  au point médian de la courbe d'absorption lissée produite par les données lorsque la concentration logarithmique est portée en fonction du temps (sur une échelle arithmétique).

### MÉTHODE DE CALCUL INFORMATIQUE DES CONSTANTES DE VITESSE D'ABSORPTION ET D'ÉLIMINATION (PERTE)

Pour obtenir le facteur de bioconcentration et les constantes de vitesse  $k_1$  et  $k_2$  on utilisera de préférence des méthodes informatiques non linéaires d'estimation paramétriques. Ces programmes établissent les valeurs de  $k_1$  et  $k_2$  en fonction d'un ensemble de données séquentielles de concentration dans le temps et du modèle :

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 2]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[équation 3]}$$

où  $t_c$  = temps à la fin de la phase d'absorption.

Cette démarche débouche sur des estimations de l'écart-type pour  $k_1$  et  $k_2$ .

Puisqu'on peut dans la plupart des cas estimer  $k_2$  à partir de la courbe d'élimination et ce avec une précision relativement grande, et puisqu'il existe une forte corrélation entre les deux paramètres  $k_1$  et  $k_2$ , il peut être souhaitable de calculer d'abord  $k_2$  à partir des données d'élimination uniquement, puis de calculer  $k_1$  à partir des données d'absorption à l'aide d'une régression non linéaire.

## C.14. POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVENILES

### 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité sur la croissance des juvéniles reprend la ligne directrice n°215 de l'OCDE (2000).

#### 1.1 INTRODUCTION

Cet essai vise à évaluer les effets d'une exposition prolongée à des produits chimiques sur la croissance des poissons au stade juvénile. Il s'appuie sur une méthode mise au point et soumise à des essais tournants (1)(2) dans l'Union européenne, qui a pour objet d'évaluer les effets de substances chimiques sur la croissance de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au stade juvénile dans des conditions dynamiques. D'autres espèces de poissons bien étudiées peuvent être utilisées. Par exemple, on possède une certaine expérience des essais de croissance sur le danio (*Danio rerio*)<sup>1</sup> (3)(4) et sur le medaka (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Voir aussi Introduction générale Partie C.

#### 1.2 DEFINITIONS

**Concentration minimale avec effet observé (CMEO):** la plus faible concentration de la substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à  $p < 0.05$ ) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CMEO.

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

**CE<sub>x</sub>:** dans la méthode décrite pour cet essai, la concentration de la substance d'essai qui provoque une variation de x pour cent du taux de croissance des poissons par rapport aux témoins.

**Taux de charge:** le poids frais des poissons par unité de volume d'eau.

**Densité de peuplement:** le nombre de poissons par unité de volume d'eau.

**Taux de croissance spécifique de chaque poisson:** le taux de croissance d'un individu par rapport à son poids initial.

**Taux de croissance spécifique moyen par récipient:** le taux de croissance moyen de la population d'un récipient (cuve) à une concentration donnée.

**Taux de croissance pseudo-spécifique:** le taux de croissance individuel comparé au poids initial moyen de la population du récipient.

---

<sup>1</sup> Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

### 1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

Des juvéniles en phase de croissance exponentielle sont pesés, puis placés dans des enceintes expérimentales où ils sont exposés à une gamme de concentrations sublétales de la substance d'essai dissoute dans l'eau, de préférence dans des conditions dynamiques ou, à défaut, dans des conditions semi-statiques (renouvellement discontinu) adéquates. L'essai dure 28 jours. Les poissons sont nourris quotidiennement. La ration alimentaire est déterminée en fonction du poids initial des poissons et peut être recalculée après 14 jours. On pèse à nouveau les poissons à la fin de l'essai. Les effets sur le taux de croissance sont analysés à l'aide d'un modèle de régression afin d'estimer la concentration qui provoquerait une variation de x pour cent du taux de croissance, soit  $CE_x$  ( $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$ , ou  $CE_{30}$ , par exemple). Les données peuvent aussi être comparées aux valeurs des témoins pour déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO).

### 1.4 INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir méthode d'essai C.1) réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Cela implique que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et que l'on dispose d'une méthode d'analyse fiable pour déterminer la quantité de substance dans les solutions d'essai avec une précision et une limite de détection connues et mentionnées dans le rapport.

Il est utile de connaître la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le  $pK_a$ , le  $P_{oc}$  et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode d'essai C. 4).

### 1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

- la mortalité dans le(s) groupe (s) témoin (s) ne doit pas dépasser 10 pour cent à la fin de l'essai;
- le poids moyen des poissons du (des) groupe (s) témoin (s) doit avoir augmenté suffisamment pour que la variation minimale du taux de croissance qui est jugée significative soit détectable. Un essai tournant (2) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, le poids moyen des poissons dans les groupes témoins doit avoir au moins doublé ( soit 50 %) par rapport à leur poids moyen initial sur 28 jours; par exemple, poids initial: 1 g/poisson (= 100 %), poids final après 28 jours:  $\geq 1.5$  g/poisson ( $\geq 150$  %);
- la concentration de l'oxygène dissous doit se situer à au moins 60 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai;
- à aucun moment, durant l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de  $\pm 1^\circ\text{C}$  entre les enceintes expérimentales et devrait être maintenue dans un intervalle de  $2^\circ\text{C}$ , compris dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (annexe 1).

## 1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

### 1.6.1 Appareillage

On utilise du matériel courant de laboratoire et notamment:

- a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;
- b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;
- c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;
- d) des récipients (cuves) fabriqués en un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir paragraphe 1.8.5 et annexe 1);
- e) une balance suffisamment précise (précision de  $\pm 0.5$  %).

### 1.6.2 Eau

Toute eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux de survie et de croissance à long terme adéquates peut être utilisée pour l'essai. Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau sera compris dans un intervalle de 6,5 à 8,5 unités, mais sans varier de plus de  $\pm 0.5$  unité (de pH) au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l ( $\text{CaCO}_3$ ) est recommandée. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), en principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ , par exemple), en pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, par exemple), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que la qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante durant au moins un an, on pourra espacer les déterminations (par exemple tous les 6 mois). Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'annexe 2.

### 1.6.3 Solutions d'essai

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitateur ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée.

L'emploi de solvants ou de dispersants (agents solubilisants) peut être indiqué dans certains cas pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide et le triéthylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01% et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsqu'on utilise des agents facilement biodégradables (comme l'acétone) et/ou des composés très volatils car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. Lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il ne doit pas avoir d'effet significatif sur la croissance des poissons ni d'effets nocifs visibles sur les juvéniles, ce que révélera l'observation d'un témoin ne comprenant que le solvant.



Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, au cours de l'essai, et ne devraient pas varier de plus de 10 pour cent tout au long de celui-ci. Un essai tournant (2) a montré que, pour la truite arc-en-ciel, une fréquence de renouvellement de l'eau au cours de l'essai de 6 litres/g de poisson/jour était acceptable (voir paragraphe 1.8.2.2).

S'agissant des essais semi-statiques (essais avec renouvellement), la fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si des essais de stabilité préliminaires (voir paragraphe 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort d'un intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou qu'elle tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudra envisager de pratiquer un essai dynamique.

#### 1.6.4 **Sélection de l'espèce**

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est recommandée dans cet essai car c'est à propos de cette espèce que l'on a acquis la plus grande expérience au cours d'essais tournants (1)(2). D'autres espèces bien étudiées peuvent cependant être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Par exemple, on dispose également d'une certaine expérience au sujet du danio (*Danio rerio*) (3)(4) et du medaka (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7). Dans ce cas, le choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doit être justifié.

#### 1.6.5 **Soins des poissons**

Les poissons d'essai seront sélectionnés au sein d'une même population, issue de préférence du même frai, qui aura été gardée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'illumination similaires à celles de l'essai. Ils devraient recevoir une ration alimentaire quotidienne atteignant au moins 2% de leur poids corporel et de préférence 4 % pendant toute la durée des soins et de l'essai.

Après une période de mise en condition de 48 heures, on mesure la mortalité et on applique les critères suivants

- mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté;
- mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: période d'acclimatation prolongée de sept jours; si la mortalité dépasse 5 % pendant la deuxième période de sept jours, le lot entier est rejeté;
- mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.

Les poissons ne devraient pas recevoir un traitement pour une maladie durant les deux semaines précédant l'essai ou pendant l'essai.

## 1.7 CONCEPTION DE L'ESSAI

Par « conception de l'essai », on entend le choix du nombre et de l'espacement des concentrations d'essai, le nombre de récipients par concentration et le nombre de poissons par récipient. Idéalement, l'essai devrait être conçu en fonction de:

- a) l'objectif de l'étude;
- b) la méthode d'analyse statistique qui sera utilisée;
- c) la disponibilité et le coût des ressources expérimentales.

L'énoncé de l'objectif devrait, si possible, spécifier la puissance statistique que requiert une différence donnée (par exemple, dans le taux de croissance) pour être détectée, ou encore la précision avec laquelle la  $CE_x$  doit être fournie (avec  $x = 10, 20, \text{ ou } 30$ , par exemple et de préférence pas au-dessous de 10) pour être estimée. Faute de quoi il est impossible de donner une indication précise de l'échelle de l'étude.

Il importe de reconnaître qu'une conception qui est optimale (qui tire le meilleur parti des ressources) lorsqu'on utilise une certaine méthode d'analyse statistique ne l'est pas nécessairement avec une autre méthode. La conception recommandée pour l'estimation d'une CMEO/CSEO ne sera donc pas identique à celle recommandée pour une analyse par régression.

Dans la plupart des cas, l'analyse par régression est préférable à l'analyse de la variance, pour des raisons exposées par Stephan et Rogers (8). Cependant, si on ne trouve aucun modèle de régression adéquat ( $r^2 < 0.9$ ), il faut recourir à la CSEO/CMEO.

### 1.7.1 Conception pour l'analyse par régression

Les considérations importantes pour la conception d'un essai à analyser par régression sont les suivantes:

- a) La concentration avec effet (par exemple,  $CE_{10,20,30}$ ) et la gamme de concentrations dans laquelle la substance d'essai produit un effet intéressant doivent nécessairement être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. La précision avec laquelle les concentrations produisant un effet peuvent être estimées sera la meilleure lorsque la concentration avec effet se trouve au milieu de la plage des concentrations testées. Un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut s'avérer utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.
- b) Pour satisfaire les conditions de la modélisation statistique, l'essai doit comporter au moins un récipient témoin et cinq autres à différentes concentrations. Le cas échéant, lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il faudrait étudier un groupe témoin contenant l'agent solubilisant à la concentration d'essai la plus élevée en plus des groupes d'essai (voir paragraphes 1.8.3 and 1.8.4).
- c) Une série géométrique ou logarithmique appropriée (9) (voir annexe 3) peut être utilisée. Un espacement logarithmique entre les concentrations d'essai est préférable.
- d) Si on dispose de plus de six récipients, les récipients supplémentaires devraient servir de répliques ou être répartis dans la gamme des concentrations de manière à diminuer l'espacement entre les concentrations. Ces deux mesures sont aussi valables l'une que l'autre.

### 1.7.2 **Conception pour l'estimation de la CSEO/CMEO à l'aide de l'analyse de la variance**

Il serait préférable d'avoir plusieurs récipients répliques pour chaque concentration, et d'effectuer l'analyse statistique au niveau du récipient (10). Sans récipients répliques, il est impossible de prendre en compte la variabilité entre les récipients en plus de celle qui existe d'un poisson à l'autre. L'expérience a cependant montré (11) que la variabilité entre les récipients était très inférieure à celle qui existe au sein de chaque récipient (autrement dit, entre les poissons) dans le cas examiné. C'est pourquoi une alternative relativement acceptable consiste à effectuer l'analyse statistique au niveau de chaque poisson.

On doit normalement utiliser au moins cinq concentrations d'essai selon une série géométrique obéissant à un facteur qui ne dépasse pas de préférence 3.2.

Généralement, lorsque les essais sont conduits dans des récipients répliques, le nombre de récipients témoins répliques, et par conséquent le nombre de poissons, devrait être le double du nombre choisi à chaque concentration d'essai, qui devrait être toujours le même (12)(13)(14). A contrario, sans récipients répliques, le nombre de poissons dans le groupe témoin devrait être le même que dans chaque concentration d'essai.

Si l'analyse de la variance est conduite au niveau des récipients plutôt qu'à celui des poissons (ce qui exigerait un marquage individuel des poissons ou l'utilisation de taux de croissance « pseudo-spécifiques » [voir paragraphe 2.1.2]), il faut un nombre suffisant de récipients répliques pour pouvoir déterminer l'écart-type entre les « récipients de même concentration ». Ce qui signifie que l'erreur dans l'analyse de la variance ait au moins 5 degrés de liberté (10). Si seuls les témoins ont des répliques, la variabilité de l'erreur risque d'être faussée puisqu'elle pourrait s'accroître avec la valeur moyenne du taux de croissance en question. Comme le taux de croissance a des chances de diminuer lorsque la concentration augmente, on aura tendance à surestimer la variabilité.

## 1.8 **MODE OPERATOIRE**

### 1.8.1 **Sélection et pesée des poissons d'essai**

Il importe que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. On trouvera à l'annexe 1 les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Idéalement, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble du lot de poissons utilisés dans l'essai devrait rester comprise dans un intervalle de  $\pm 10\%$  de la moyenne arithmétique et en aucun cas excéder 25 %. Il est recommandé de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent le début de l'essai. Ils sont ensuite choisis au hasard. A l'aide d'un anesthésique général (par exemple, une solution aqueuse de 100 mg/litre de méthanesulphonate de tricaïne (MS 222) neutralisée par l'adjonction de deux parts de bicarbonate de sodium par part de MS 222), les poissons doivent être pesés individuellement en poids frais (blotted dry, poissons essuyés) avec la précision indiquée à l'annexe 1. Les poissons dont le poids se situe à l'intérieur de l'intervalle voulu seront retenus puis répartis au hasard entre les récipients d'essai. On notera le poids frais (wet weight) total des poissons dans chaque récipient. L'utilisation d'anesthésique de même que la manipulation des poissons (y compris le séchage et la pesée) peuvent stresser et blesser les jeunes poissons, en particulier les espèces de petite taille. Les juvéniles doivent donc être manipulés avec la plus grande précaution afin d'éviter de stresser et de blesser les animaux testés.

Les poissons sont pesés à nouveau le 28<sup>ème</sup> jour de l'essai (voir paragraphe 1.8.6). Si toutefois on juge nécessaire de recalculer la ration alimentaire, on pèsera à nouveau les poissons au 14<sup>ème</sup> jour de l'essai (voir paragraphe 1.8.2.3). On pourra recourir à une autre méthode telle que la technique photographique par exemple pour évaluer les variations de taille des poissons à partir de quoi la ration alimentaire pourra être ajustée.

## 1.8.2 **Conditions d'exposition**

### 1.8.2.1 *Durée*

La durée de l'essai est  $\geq 28$  jours.

### 1.8.2.2 *Taux de charge et densité de peuplement*

Il importe que le taux de charge et la densité soient adaptés à l'espèce testée (voir annexe 1). Si la densité de peuplement est trop élevée, le stress engendré par la surpopulation entraînera une diminution des taux de croissance, et probablement la maladie. Si elle est trop faible, elle peut induire un comportement territorial susceptible d'affecter également la croissance. En tout état de cause, le taux de charge doit être suffisamment bas pour que la concentration de l'oxygène dissous puisse être maintenue à au moins 60% de la valeur de saturation en air, sans aération. Un essai tournant (2) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, un taux de charge de 16 truites de 3 à 5 grammes dans un volume de 40 litres était acceptable. La fréquence de renouvellement de l'eau recommandée durant l'essai est de 6 litres/g de poissons par jour.

### 1.8.2.3 *Alimentation*

Les poissons doivent recevoir une alimentation adéquate (annexe 1) en quantité suffisante pour permettre un taux de croissance acceptable. Il faut veiller à éviter la prolifération microbienne et la turbidité de l'eau. Dans le cas de la truite arc-en-ciel, une ration quotidienne de 4% de son poids corporel par jour devrait remplir ces conditions (2)(15)(16)(17). La ration quotidienne peut être divisée en deux parts égales et administrée aux poissons en deux fois, à au moins 5 heures d'intervalle. La ration est fonction du poids total initial des poissons dans chaque récipient d'essai. Si les poissons sont pesés à nouveau le 14<sup>ème</sup> jour, on recalcule la ration. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent leur pesée.

Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être enlevés quotidiennement des récipients d'essai par un nettoyage soigneux du fond de chaque récipient à l'aide d'un suceur.

### 1.8.2.4 *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (annexe 1).

## 1.8.3 **Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai, quelle que soit la conception de l'essai (voir paragraphe 1.7.2). Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (tirée par exemple d'un essai de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter le choix des concentrations d'essai adéquates. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la limite de solubilité de la substance dans l'eau.

Si un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation de la solution mère, sa concentration finale ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit, de préférence, être identique dans tous les récipients d'essai (voir paragraphe 1.6.3). Le recours à ce genre de produit devrait cependant être évité dans toute la mesure du possible.

#### 1.8.4 **Témoins**

Le nombre de récipients témoins contenant l'eau de dilution dépend de la conception de l'essai (voir paragraphes 1.7-1.7.2). Si l'on utilise un agent solubilisant, on inclura le même nombre de témoins pour l'eau de dilution que pour l'agent solubilisant.

#### 1.8.5 **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers (voir ci-après).

Dans les essais dynamiques, les débits du diluant et de la solution mère de substance toxique seront vérifiés périodiquement, de préférence chaque jour. Ces débits ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Lorsque les concentrations de la substance d'essai sont censées ne pas s'écarter de  $\pm 20$  % des valeurs nominales (autrement dit rester comprises dans une plage de 80 à 120 %; voir paragraphes 1.6.2 and 1.6.3), on recommande d'analyser au moins la concentration la plus basse et la plus élevée au début de l'essai et périodiquement toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de  $\pm 20$  % des valeurs nominales (d'après les données sur la stabilité de la substance d'essai), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, mais selon le même régime.

Dans les essais semi-statiques (avec renouvellement) où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de  $\pm 20$  % des valeurs nominales, il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée juste après leur préparation et juste avant le renouvellement au début de l'essai et toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de  $\pm 20$  % des valeurs nominales, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations selon le même régime que pour les substances plus stables.

On préconise de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles démontrent que la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue, tout au long de l'essai, dans un intervalle de  $\pm 20$  % autour de la concentration nominale ou de la concentration mesurée au départ, les résultats peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées.

Il peut s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à pores de 0,45  $\mu\text{m}$ ) ou de centrifuger les échantillons. La centrifugation est la procédure recommandée. Toutefois, si le milieu d'essai ne s'absorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale, l'alcalinité et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurées dans les récipients témoins et dans celui qui contient la concentration la plus forte. L'oxygène dissous et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, on recommande de mesurer l'oxygène dissous plus souvent, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Il faut mesurer le pH au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais à renouvellement statique et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. La dureté et l'alcalinité devraient être mesurées une fois au cours de chaque essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins un récipient d'essai.

### 1.8.6 Observations

Poids: à la fin de l'essai tous les poissons survivants seront pesés en poids frais (poissons essuyés, blotted dry) soit en groupes par récipient d'essai soit individuellement. Il est préférable de peser les animaux par récipient d'essai plutôt qu'individuellement, cette dernière méthode obligeant à marquer chaque poisson. Si l'on mesure le taux de croissance spécifique de chaque poisson (pesée individuelle), la technique de marquage devra être choisie de façon à perturber le moins possible les animaux (on peut utiliser une technique différente du cryo-marquage (par congélation), par exemple un mince fil de pêche coloré).

Il faut examiner quotidiennement les poissons durant l'essai et relever toutes les anomalies externes éventuelles (hémorragie, décoloration, par exemple) et les comportements anormaux. Les décès doivent être comptés et les poissons morts retirés du récipient dès que possible. Les poissons morts ne seront pas remplacés, le taux de charge et la densité de peuplement étant suffisamment élevés pour éviter que la modification du nombre de poissons ait des effets sur la croissance. Cependant, la ration alimentaire devra être ajustée.

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, car cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai, de poissons etc.. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, aucune orientation ou méthode statistique précise n'est proposée ici.

Il n'y a pas lieu de calculer les taux de croissance dans les récipients d'essai où la mortalité dépasse 10 %. Le taux de mortalité doit cependant être spécifié pour toutes les concentrations d'essai.

Quelle que soit la méthode utilisée pour analyser les données, le concept central est le taux de croissance spécifique  $r$  entre l'instant  $t_1$  et l'instant  $t_2$ . Il peut être défini de diverses manières selon que les poissons ont été ou non marqués individuellement ou selon qu'on recherche une moyenne par récipient.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$
$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$
$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

où :

$r_1$  = taux de croissance spécifique de chaque poisson

$r_2$  = taux de croissance spécifique moyen par récipient

$r_3$  = taux de croissance « pseudo »- spécifique

$w_1, w_2$  = poids d'un poisson donné aux instants  $t_1$  et  $t_2$ , respectivement

$\log_e w_1$  = logarithme du poids d'un poisson donné au début de la période d'étude

$\log_e w_2$  = logarithme du poids d'un poisson donné à la fin de la période d'étude

$\overline{\log_e w_1}$  = moyenne des logarithmes des valeurs  $w_1$  des poissons du récipient au début de la période d'étude

$\overline{\log_e w_2}$  = moyenne des logarithmes des valeurs  $w_2$  des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

$t_1, t_2$  = moments (jours) du début et de la fin de la période d'étude

$r_1, r_2, r_3$  peuvent être calculés pour la période comprise entre le jour 0 et le jour 28 et, s'il y a lieu (c'est-à-dire lorsqu'une mesure a été effectuée au 14<sup>ème</sup> jour) pour les périodes entre 0 et 14 jours et 14 et 28 jours.

### 2.1.1 Analyse des résultats par régression (modélisation concentration-effet)

Cette méthode d'analyse établit une relation mathématique adéquate entre le taux de croissance spécifique et la concentration, ce qui permet d'estimer la «  $CE_x$  » c'est-à-dire toute valeur de CE requise. Si l'on utilise cette méthode, il est inutile de calculer  $r$  pour chaque poisson ( $r_1$ ) et l'analyse peut alors s'appuyer sur la valeur moyenne de  $r$  pour le récipient ( $r_2$ ). Cette dernière méthode est préférable. En outre, elle se prête mieux à l'utilisation d'espèces plus petites.

Pour étudier la relation concentration-effet, on porte sur un graphique les taux de croissance spécifiques moyens par récipient ( $r_2$ ) en fonction de la concentration.

Pour exprimer la relation entre  $r_2$  et la concentration, il convient de choisir un modèle adéquat et d'étayer ce choix par un raisonnement pertinent.

Si le nombre de poissons survivants varie suivant le récipient, le processus d'ajustement du modèle, qu'il soit simple ou non linéaire, doit être pondéré pour tenir compte de la taille inégale des groupes.

La méthode d'ajustement du modèle doit permettre d'estimer, par exemple, la  $CE_{20}$  et de déduire sa dispersion (écart-type ou intervalle de confiance). Le graphique du modèle ajusté devrait être montré en regard des données pour permettre d'apprécier l'adéquation de l'ajustement du modèle (8)(18)(19)(20).

### 2.1.2 Analyse des résultats pour l'estimation de la CMEO

Si le test porte sur plusieurs récipients d'essai répliques (identiques) pour toutes les concentrations, l'estimation de la CMEO pourrait s'appuyer sur une analyse de la variance du taux de croissance spécifique moyen de chaque récipient (voir paragraphe 2.1), suivie de l'utilisation d'une méthode pertinente (par exemple, un test de Dunnett ou de Williams (12)(13)(14)(21)) consistant à comparer la moyenne  $\bar{r}$  à chaque concentration avec la moyenne  $\bar{r}$  des témoins, afin d'identifier la concentration minimale à laquelle cette différence est significative avec un seuil de probabilité de 0,05. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne sont pas remplies – distribution non normale (par exemple, test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett), il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de mener l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse pondérée de la variance.

Si l'essai ne porte pas sur plusieurs récipients par concentration, l'analyse de la variance fondée sur les récipients sera insensible ou impossible. Dans ces circonstances, on peut parvenir à un compromis acceptable en fondant l'analyse de la variance sur le taux de croissance 'pseudo' spécifique  $r_3$  de chaque poisson.

La moyenne  $r_3$  pour chaque concentration d'essai peut ensuite être comparée à la moyenne  $r_3$  des témoins. Et la CMEO peut alors être déterminée comme précédemment. Il faut admettre que cette méthode ne tient absolument pas compte de la variabilité entre les récipients, en dehors de celle imputable à la variabilité entre les poissons, et n'offre aucune protection à cet égard. L'expérience a cependant montré (8) que la variabilité entre les récipients était très faible par rapport à celle qui existe dans les récipients (c'est-à-dire entre les poissons). Si l'analyse n'englobe pas les données concernant chaque poisson, il convient d'indiquer la méthode d'identification des valeurs aberrantes (erronées) et de justifier son emploi.

## 2.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse ou, dans les essais semi-statiques, lorsque la concentration de la substance d'essai diminue entre le moment où la solution vient d'être préparée et le moment qui précède le renouvellement.

## 2.3 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes:

### 2.3.1 Substance d'essai:

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.



### 2.3.2 **Espèce testée:**

- nom scientifique;
- souche éventuelle, taille, fournisseur, traitement préalable éventuel, etc.

### 2.3.3 **Conditions d'essai:**

- méthode utilisée (par exemple, semi-statique/avec renouvellement, dynamique, charge, densité de peuplement, etc.);
- conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai et de répliques, nombre de poissons par récipient);
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solubilisant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant);
- concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode de détermination et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie;
- caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, alcalinité, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore (si mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, dureté, température et concentration de l'oxygène dissous;
- informations détaillées sur l'alimentation, (par exemple, le type d'aliment (s), la source, la quantité donnée et la fréquence).

### 2.3.4 **Résultats:**

- données montrant que les témoins remplissent les critères de validité relatifs à la survie, et données sur la mortalité à toutes les concentrations d'essai;
- techniques d'analyse statistique appliquées, statistiques fondées sur les répliques ou les poissons, traitement des données et justification des méthodes utilisées;
- tableaux donnant les poids individuels et moyens des poissons aux jours 0, 14 (si mesurés) et 28, valeurs des moyennes par récipient ou taux de croissance pseudo- spécifiques (s'il y a lieu) pour les périodes de 0 à 28 jours, ou éventuellement de 0 à 14 et de 14 à 28 jours;
- résultats de l'analyse statistique (analyse par régression ou analyse de la variance) fournis de préférence sous forme de tableau ou de graphique, CME0 ( $p = 0.05$ ) et CSE0 ou  $CE_x$  avec leurs écarts-types si possible;
- incidence de toute réaction inhabituelle des poissons et de tout effet visible produit par la substance d'essai.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, **14**, pp 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, **21**, pp 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. **28**, pp 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- (8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**, pp 482-491.
- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics **27**, pp 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture **120**, 123-133.

- (16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- (18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- (20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp 510-531.

ANNEXE 1

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI ET CONDITIONS D'ESSAI APPROPRIÉES

Espèce	Gamme de températures recommandée (°C)	Photopériode (heures)	Gamme recommandée pour le poids initial des poissons (g)	Précision requise de la mesure	Taux de charge (g/l)	Densité de peuplement (par litre)	Alimentation	Durée de l'essai (jours)
<b>Espèce recommandée:</b>								
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> Truite arc-en-ciel	12.5 – 16.0	12 – 16	1 – 5	à 100 mg près	1.2 – 2.0	4	spécialité alimentaire sèche pour frai de salmonidé	≥ 28
<b>Autres espèces bien étudiées:</b>								
<u><i>Danio rerio</i></u> Danio	21 – 25	12 – 16	0.050 – 0.100	à 1 mg près	0.2 – 1	5 – 10	nourriture vivante ( <i>Brachionus</i> <i>Artemia</i> )	≥ 28
<u><i>Oryzias latipes</i></u> medaka	21 – 25	12 – 16	0.050 – 0.100	à 1 mg près	0.2 – 1.0	5 – 20	nourriture vivante ( <i>Brachionus</i> <i>Artemia</i> )	≥ 28

ANNEXE 2

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matières particulaires (particules)	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

**ANNEXE 3**

**SÉRIE LOGARITHMIQUE DE CONCENTRATIONS CONVENANT A UN ESSAI DE TOXICITÉ** (9)

Colonne (Nombre de concentrations entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

\* Une série de cinq concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l or µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10, adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

## C.15. POISSON, ESSAI DE TOXICITE A COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN

### 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité à court terme reprend la ligne directrice n° 212 de l'OCDE (1998).

#### 1.1 INTRODUCTION

Cet essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin consiste à exposer l'animal depuis le stade de l'œuf qui vient d'être fécondé jusqu'à la fin du stade de l'alevin. Aucune alimentation n'est fournie durant l'essai sur les embryons et les alevins, et l'essai devrait donc prendre fin alors que les alevins se nourrissent encore grâce à leur sac vitellin.

Cet essai vise à déterminer les effets létaux et, dans une moindre mesure, sublétaux de produits chimiques à des stades définis de la vie des espèces testées. Il devrait fournir des informations utiles en ce sens qu'il pourrait (a) permettre de faire le lien entre les essais létaux et sublétaux, (b) servir d'essai de sélection en vue soit d'un essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, soit d'un essai de toxicité chronique, et (c) être utilisé pour tester des espèces pour lesquelles les techniques d'élevage ne sont pas suffisamment au point pour couvrir la période de transition entre alimentation endogène et alimentation exogène.

Il faut savoir que seuls les essais couvrant tous les stades de la vie du poisson sont généralement susceptibles de donner une estimation précise de la toxicité chronique de produits chimiques pour les poissons, et que toute limitation de l'exposition écartant tel ou tel stade de la vie risque de diminuer la sensibilité et donc de donner lieu à une sous-estimation de la toxicité chronique. L'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin devrait donc être moins sensible que l'essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, notamment en ce qui concerne les produits chimiques fortement lipophiles ( $\log P_{oc} > 4$ ) et les substances possédant un mode d'action toxique particulier. On s'attend toutefois à ce que la différence de sensibilité entre les deux essais soit moindre pour les produits chimiques à mode d'action narcotique non spécifique (1).

Avant la publication du présent essai, l'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin a surtout été réalisé sur le poisson d'eau douce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (téléostéens, cyprinidés – nom commun : danio). C'est la raison pour laquelle l'annexe 1 donne des indications détaillées pour la réalisation de l'essai sur cette espèce. Cela n'exclut pas pour autant l'utilisation d'autres espèces de poissons pour lesquelles on dispose déjà d'une certaine expérience (Tableau 1).

#### 1.2 DÉFINITIONS

**Concentration minimale avec effet observé (CMEO) :** concentration la plus basse d'une substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO.

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

### 1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

Les poissons aux stades de l'embryon et de l'alevin sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dissoute dans l'eau. Le protocole permet de choisir entre un essai semi-statique ou dynamique. Le choix dépend de la nature de la substance d'essai. L'essai débute au moment où l'on place les œufs fécondés dans les enceintes expérimentales et prend fin juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale ait été complètement absorbé ou avant que des poissons témoins ne meurent d'inanition. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). Une autre possibilité consiste à analyser ces effets à l'aide d'un modèle de régression permettant d'estimer la concentration qui provoquerait un certain pourcentage d'effet (CL/CE<sub>x</sub>, où x représente un pourcentage d'effet défini).

### 1.4 INFORMATIONS CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Ces résultats pourront s'avérer utiles pour sélectionner une plage de concentrations appropriée pour l'essai aux premiers stades de la vie. La solubilité dans l'eau (y compris la solubilité dans l'eau de l'essai) et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Pour déterminer la concentration de la substance dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.

Les informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/ eau (P<sub>oc</sub>) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir Méthode C.4).

### 1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes :

- le taux global de survie des œufs fécondés dans les groupes témoins et, s'il y a lieu, dans les récipients ne contenant que le solvant, doit être supérieur ou égal aux limites définies dans les annexes 2 et 3;
- la concentration de l'oxygène dissous doit se situer entre 60 et 100 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai ;
- à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de  $\pm 1,5$  °C entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs, et devrait être maintenue dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (annexes 2 et 3).

### 1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

#### 1.6.1 Enceintes d'essai

N'importe quel récipient en verre ou fabriqué dans un matériau chimiquement inerte peut être utilisé. Les récipients doivent être suffisamment grands pour répondre aux critères de charge (voir paragraphe 1.7.1.2). Il est recommandé de placer les enceintes expérimentales au hasard dans la partie du laboratoire où se déroule l'essai. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma randomisé par blocs, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de les placer de façon complètement aléatoire, lorsqu'il existe des effets systématiques dans le laboratoire qui peuvent être contrecarrés par la randomisation par blocs. Si celle-ci est utilisée, elle doit être prise en compte dans l'analyse ultérieure des résultats. Les enceintes expérimentales doivent être protégées de toute perturbation indésirable.



### 1.6.2 **Sélection des espèces de poissons**

Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1A. Cela n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces (des exemples figurent dans le tableau 1B), mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Dans ce cas, la choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doivent être justifiées.

### 1.6.3 **Soin des poissons géniteurs**

La ligne directrice 210 de l'OCDE<sup>1</sup> et les références (2)(3)(4)(5)(6) donnent des indications détaillées sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

### 1.6.4 **Manipulation des embryons et des larves**

Les embryons et les larves peuvent être exposés, au sein de la cuve principale, dans des récipients plus petits pourvus de côtés ou d'extrémités en filet, permettant le passage de la solution d'essai. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent dans ces petits récipients en les suspendant à un bras qui déplace le récipient verticalement, en gardant toujours les organismes submergés; un système de siphon peut aussi être employé. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion. Les pipettes Pasteur conviennent au prélèvement des embryons et des larves dans les essais semi-statiques où le milieu est entièrement renouvelé chaque jour (voir paragraphe 1.6.6).

Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve d'essai principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves<sup>1</sup>, mais il faut conserver des filets pour empêcher les poissons de s'échapper. Si les larves doivent être transférées, il ne faut pas les exposer à l'air, ni utiliser de filets pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs (ces précautions sont superflues pour des espèces moins fragiles, comme la carpe). Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et il n'est pas toujours nécessaire. Dans les essais semi-statiques, des béciers ou des récipients peu profonds peuvent être utilisés, munis, si nécessaire, d'une grille placée un peu au-dessus du fond du récipient. Si le volume de ces récipients est suffisant pour satisfaire aux critères de charge (voir paragraphe 1.7.1.2), il n'est pas nécessaire de transférer les embryons ou les larves.

### 1.6.5 **Eau**

Toute eau répondant aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable (énumérées à l'annexe 4) et dans laquelle les témoins de l'espèce testée ont un taux de survie au moins aussi satisfaisant que celui décrit dans les annexes 2 et 3 peut être utilisée pour l'essai. La qualité de cette eau devrait rester constante pendant toute la durée de l'essai. La variation du pH devrait rester comprise dans un intervalle de  $\pm 0,5$  unités. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai) ou ne nuira pas au comportement des poissons géniteurs, des échantillons doivent être prélevés périodiquement en vue d'être analysés. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (par exemple, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), en principaux anions et cations (par exemple, Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>), en pesticides (par exemple, la totalité des organophosphorés et la totalité des organochlorés), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, lorsqu'on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante sur une période d'au moins un an, les déterminations pourront être plus espacées (par exemple, tous les six mois).

---

<sup>1</sup> OCDE, Paris, 1992, Ligne directrice 210, " Poisson, Essai de toxicité aux premiers stades de la vie".

## 1.6.6 Solutions d'essai

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation mécanique de la substance d'essai dans l'eau de dilution, (par exemple, au moyen d'un agitateur ou par ultrasons). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée. Le recours à des solvants ou dispersants (agents solubilisants) doit être évité dans toute la mesure du possible; il peut toutefois s'avérer nécessaire d'utiliser ces produits pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 pour cent et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsqu'on utilise des agents facilement biodégradables (par exemple, l'acétone) et/ou volatils, car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. L'agent solubilisant, le cas échéant, ne doit pas exercer d'effet significatif sur la survie, ni nuire de façon visible aux premiers stades de la vie, d'après l'observation d'un témoin ne comportant que le solvant. Cependant, l'usage de ces substances doit être évité dans toute la mesure du possible.

S'agissant des essais semi-statiques, deux méthodes de renouvellement peuvent être adoptées : soit (i) les nouvelles solutions d'essai sont préparées dans des récipients propres et l'on transvase avec précaution les œufs et larves survivants dans les nouveaux récipients avec un petit volume de solution ancienne, en évitant de les exposer à l'air, soit (ii) les organismes testés sont laissés dans leur récipient d'essai pendant qu'on renouvelle au moins les trois-quarts de leur eau. La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si les tests préliminaires de stabilité (voir paragraphe 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (sort de l'intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudrait envisager de pratiquer un essai dynamique. Quoi qu'il en soit, il convient d'éviter de stresser les larves durant le renouvellement de l'eau.

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu la solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, et ne devraient pas varier de plus de 10 pour cent tout au long de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes expérimentales par 24 heures s'est avéré adéquat (2).

## 1.7 MODE OPERATOIRE

Des informations utiles concernant la marche à suivre pour les essais de toxicité sur les embryons de poisson et les alevins se trouvent dans les publications; la bibliographie de ce texte en donne quelques références (7)(8)(9).

### 1.7.1 Conditions d'exposition

#### 1.7.1.1 Durée

L'essai devrait débiter de préférence dans les 30 minutes qui suivent la fécondation des œufs. Les embryons sont immergés dans la solution d'essai avant, ou aussitôt que possible après, le commencement de la phase de segmentation du blastodisque, et, dans tous les cas, avant le début du stade de la gastrula. Quand les œufs proviennent d'un fournisseur commercial, il n'est pas toujours possible de débiter l'essai juste après la fécondation. Comme la sensibilité de l'essai peut être fortement influencée par un retard dans son lancement, l'essai devrait débiter dans les 8 heures qui suivent la fécondation. Les larves n'étant pas nourries durant la période d'exposition, l'essai doit s'achever juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale soit complètement absorbé ou avant que les témoins ne meurent d'inanition. La durée de l'essai dépend de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées aux annexes 2 et 3.

#### 1.7.1.2 *Charge*

Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Il y a lieu de les répartir au hasard entre les différents traitements et d'utiliser au moins 30 œufs fécondés répartis en nombre égal (ou aussi proche de l'égalité que possible, car il peut être difficile d'obtenir des lots identiques avec certaines espèces) entre au moins trois enceintes d'essai identiques pour chaque concentration. Le taux de charge (biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment bas pour qu'une concentration d'oxygène dissous d'au moins 60 pour cent de la valeur de saturation en air puisse être maintenue sans aération. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution, à tout moment, a été recommandé (2).

#### 1.7.1.3 *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir annexes 2 et 3). En vue de surveiller la température, il peut être approprié d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire.

#### 1.7.2 **Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3,2. La courbe de la  $CL_{50}$  en fonction de la période d'exposition, obtenue au cours de l'étude de toxicité aiguë, doit être prise en considération lors de la sélection de la plage des concentrations d'essai. Il peut être judicieux, dans certaines circonstances, d'utiliser moins de cinq concentrations, par exemple, dans les essais limites, et un intervalle plus faible entre les concentrations. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à la  $CL_{50}$  après 96 heures ou supérieures à 100 mg/l lorsque la  $CL_{50}$  est supérieure à cette concentration. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans l'eau d'essai.

Lorsqu'un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir paragraphe 1.6.6), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

#### 1.7.3 **Témoins**

Un témoin contenant l'eau de dilution (en autant d'exemplaires que de besoin) et, le cas échéant, un témoin contenant l'agent solubilisant (en autant d'exemplaires que de besoin) doivent être étudiés parallèlement aux séries traitées avec la substance.

#### 1.7.4 **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de  $\pm 20$  pour cent autour de la concentration nominale (dans une plage de 80 à 120 %, voir paragraphes 1.4 et 1.6.6), il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée, dès leur préparation et juste avant le renouvellement du milieu, à au moins trois occasions régulièrement espacées au cours de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, dès leur préparation et au moment du renouvellement).

Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de  $\pm 20$  pour cent autour de la concentration nominale (d'après les résultats concernant la stabilité de la substance), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations, dès leur préparation et au moment du renouvellement, mais selon le même régime, c'est-à-dire à au moins trois occasions, régulièrement espacées au cours de l'essai. La détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être réalisée que sur un seul récipient par concentration. Les déterminations ne devraient pas être espacées de plus de sept jours. On préconise de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles montrent que la concentration de la substance d'essai dans la solution s'est maintenue correctement dans un intervalle de  $\pm 20$  pour cent autour de la concentration nominale ou mesurée au départ, tout au long de l'essai, les résultats peuvent s'appuyer sur la concentration nominale ou les valeurs mesurées au départ.

Dans le cas des essais dynamiques, il convient d'appliquer un régime de prélèvement des échantillons similaire à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais le dosage des solutions juste avant leur renouvellement ne s'applique pas ici). Néanmoins, si l'essai dure plus de sept jours, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements au cours de la première semaine (par exemple, trois séries de mesures), afin de s'assurer que les concentrations d'essai restent stables.

Il peut dans certains cas s'avérer nécessaire de filtrer (par ex. à l'aide d'un filtre à pores de 0,45 µm de diamètre) ou de centrifuger les échantillons. Toutefois, comme la centrifugation ou la filtration ne permettent pas toujours de séparer la fraction non biodisponible de la substance d'essai de sa fraction biodisponible, il peut être inutile de soumettre les échantillons à ces traitements.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale et la salinité, le cas échéant, doivent être déterminées dans les témoins et dans un des récipients contenant la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité, le cas échéant, doivent être mesurés au moins trois fois : au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, il est recommandé de mesurer l'oxygène dissous plus fréquemment, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Le pH devrait être mesuré au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais semi-statiques et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. Il faudrait déterminer la dureté une fois dans chaque essai. La température devrait être mesurée quotidiennement et, de préférence, surveillée en continu dans au moins un récipient d'essai.

## 1.7.5 **Observations**

### 1.7.5.1 *Stade de développement embryonnaire*

Le stade embryonnaire (stade de la gastrula) au début de l'exposition à la substance d'essai doit être vérifié aussi précisément que possible. Cela peut se faire sur un échantillon représentatif d'œufs bien conservés et rendus translucides. Des descriptions et des illustrations des stades embryonnaires peuvent être consultées dans les publications (2)( 5)( 10)( 11).

### 1.7.5.2 *Éclosion et survie*

Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Il peut être souhaitable d'effectuer des observations plus fréquentes au début de l'essai (par exemple, toutes les 30 minutes au cours des trois premières heures), puisque dans certains cas, les temps de survie peuvent être plus significatifs que le seul nombre de morts (notamment en cas d'effets toxiques aigus). Les larves et embryons morts doivent être retirés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement. Il convient d'être extrêmement attentif lorsqu'on retire les individus morts à ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et les larves adjacents, qui sont très délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient en fonction du stade de développement :

- **pour les œufs** : en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque.
- **pour les embryons** : absence de mouvement corporel et/ ou absence de battement du cœur et/ou décoloration opaque chez les espèces dont les embryons sont normalement transparents ;
- **pour les larves** : immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction aux stimuli mécaniques.

#### 1.7.5.3 *Aspect anormal*

On doit noter le nombre de larves présentant une anomalie corporelle et/ou de la pigmentation, ainsi que le stade de résorption du sac vitellin, à des intervalles de temps adéquats, en fonction de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Il faut savoir que des larves et embryons anormaux surviennent de façon naturelle et que leur proportion peut atteindre quelques pour cent chez le(s) témoin(s) de certaines espèces. Les animaux anormaux ne doivent être retirés des récipients d'essai qu'à leur mort.

#### 1.7.5.4 *Comportement anormal*

Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité atypique doivent être notées à des intervalles de temps qui dépendent de la durée de l'essai. Ces effets, bien que difficiles à quantifier, peuvent le cas échéant contribuer à l'interprétation des données de mortalité, en fournissant des informations sur le mode d'action toxique de la substance.

#### 1.7.5.5 *Longueur*

À la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu en utilisant la longueur standard, la longueur à la fourche ou la longueur totale. Cependant, si l'on constate une putréfaction de la nageoire caudale ou une usure des nageoires, on doit employer la longueur standard. Habituellement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation de la longueur entre les différents récipients des témoins doit être  $\leq 20\%$ .

#### 1.7.5.6 *Poids*

À la fin de l'essai, chaque individu peut être pesé ; le poids sec (24 heures à 60° C) est préférable au poids frais (poissons essuyés). Généralement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation du poids entre les différents récipients des témoins doit être  $\leq 20\%$ .

Ces observations permettront de livrer une partie ou la totalité des données suivantes à l'analyse statistique :

- mortalité cumulée ;
- nombre de larves saines à la fin de l'essai ;
- moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci (90 % d'œufs éclos dans chaque enceinte de concentration identique) ;
- nombre de larves écloses chaque jour ;
- longueur (et poids) des animaux survivants à la fin de l'essai ;
- nombre de larves déformées ou d'aspect anormal ;
- nombre de larves présentant un comportement anormal.

## 2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### 2.1 **TRAITEMENT DES RESULTATS**

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, puisque cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, le nombre de concentrations d'essai, le nombre initial d'œufs fécondés et les paramètres mesurés. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, on ne donnera pas ici d'orientations précises sur les méthodes statistiques.

Si la CMEO et la CSEO doivent être estimées, il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque série d'enceintes de concentration identique par l'analyse de la variance ou les méthodes avec tableau de contingence. La méthode de Dunnett peut être utile pour procéder à des comparaisons multiples entre les résultats obtenus à chaque concentration et ceux des témoins (12) (13). Il existe d'autres exemples pertinents (14)( 15). La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance ou par d'autres méthodes (c'est-à-dire la puissance de l'essai) devrait être calculée et mentionnée dans le rapport. Il faut savoir que les observations énumérées au paragraphe 1.7.5.6 ne se prêtent pas toutes au traitement statistique par l'analyse de la variance. A titre d'exemple, la mortalité cumulée et le nombre de larves saines à la fin de l'essai pourraient être analysés à l'aide de méthodes des probits.

S'il y a lieu d'estimer la CL et la  $CE_x$ , une courbe adéquate, telle que la courbe logistique, doit être ajustée aux résultats étudiés par une méthode statistique telle que la méthode des moindres carrés ou des moindres carrés non linéaires. La ou les courbe(s) doivent être paramétrées de façon que la CL et la  $CE_x$  recherchées et leur écart-type puissent être estimés directement. Cela facilitera beaucoup le calcul des limites de confiance autour de la CL et de la  $CE_x$ . A moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, des limites de confiance de 95 % de part et d'autre devraient être choisies. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Des méthodes graphiques d'ajustement des courbes peuvent être utilisées. Toutes les observations énumérées au paragraphe 1.7.5.6 se prêtent à l'analyse de régression.

### 2.2 **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

Les résultats doivent être interprétés avec prudence, lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse. L'interprétation des résultats concernant les concentrations supérieures à la solubilité de la substance dans l'eau doit aussi se faire avec prudence.

### 2.3 **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.3.1 **Substance d'essai :**

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

#### 2.3.2 **Espèce d'expérience :**

- nom scientifique, variété, nombre de poissons parents (c'est-à-dire nombre de femelles utilisées pour fournir le nombre d'œufs requis par l'essai), source et méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

### 2.3.3 **Conditions d'essai :**

- méthode utilisée (par exemple, semi-statique ou dynamique, temps écoulé entre la fécondation et le début de l'essai, charge, etc.) ;
- photopériode(s);
- conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales et d'exemplaires de même concentration, nombre d'embryons par exemplaire) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être spécifiés, le cas échéant) ;
- concentrations nominales de l'essai, valeurs mesurées dans les récipients d'essai, moyennes et écarts-types de celles-ci, et méthode de détermination; si la substance d'essai est soluble dans l'eau à des concentrations inférieures à celles qui ont été testées, il faut démontrer que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai dans la phase dissoute ;
- caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si elle a été mesurée), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si elle a été mesurée) et toute autre mesure effectuée;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous.

### 2.3.4 **Résultats :**

- résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai ;
- données montrant que les témoins répondent à la norme générale d'acceptabilité relative à la survie de l'espèce (annexes 2 et 3) ;
- résultats concernant la mortalité et la survie aux stades de l'embryon et de la larve et taux de mortalité et de survie globaux;
- délais d'éclosion et nombre d'œufs éclos ;
- longueur (et poids) ;
- description et fréquence des anomalies morphologiques, le cas échéant ;
- description et fréquence des effets sur le comportement, le cas échéant ;
- analyse statistique et traitement des données ;
- pour les essais soumis à l'analyse de la variance, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) à  $p = 0,05$ , et la concentration sans effet observé (CSEO) pour chaque réponse évaluée, ainsi qu'une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui peut être détecté;
- pour les essais analysés à l'aide de techniques de régression, la CL et la  $CE_x$  et leurs intervalles de confiance, et un graphique du modèle ajusté utilisé pour les calculer ;
- justification de tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final Report to the Commission of the European Communities, pp. 60. June 1990
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life- Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/ 3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/ 3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish ( *Brachydanio rerio* ) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958). Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting of Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- Buchanan). Copeia, 4, 328- 330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. et Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo- larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short- term Fish and Amphibian Embryo- larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry, 4, 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R. V. et W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R. V. et W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure- Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/ RM/ 28, décembre 1992, pp. 81.



- (17) Dave G. et Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H. et Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish ( *Danio rerio* ), a model system in developmental biology - an invitation to comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231- 236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. et Roubaud P. (1995). Toxic effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety, 32, 19-28 (1995).
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes* . EPA report EPA/ 600/ 3-91/ 064, décembre 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka ( *Oryzias latipes* ). EPA report EPA/ 600/ 3-91/ 063, décembre 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Variability in the performance of the seven- day Fathead minnow ( *Pimephales promelas* ) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10: 1189- 1203.
- (23) Calow P. (1993). Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity Tests with Early Life stages of Estuarine and Marine Fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Junk Publ., Dordrecht. 280 pp.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development. In: W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds., Fish Physiology, vol XIA, Academic Press, pp. 1- 58.

**TABLEAU 1A : ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI**

<b>EAU DOUCE</b>
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Danio (7)(17)(18)
<i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule (8)(22)

**TABLEAU 1B: EXEMPLES D'AUTRES ESPÈCES ÉGALEMENT UTILISÉES ET SUR LESQUELLES ON POSSÈDE UNE BONNE DOCUMENTATION**

<b>EAU DOUCE</b>	<b>EAU SALÉE</b>
<i>Carassius auratus</i> Cyprin doré (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Capucette nord-américaine (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Crapet arlequin (8)	<i>Clupea harengus</i> Hareng (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Morue (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton (23)(24)(25)

## ANNEXE 1

### ORIENTATIONS POUR LA RÉALISATION D'UN ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES EMBRYONS ET LES ALEVINS DU DANIO (*Brachydanio rerio*)

#### INTRODUCTION

Le danio est originaire de la côte de Coromandel, en Inde, où il peuple les rivières à courant rapide. C'est une espèce courante en aquarium, appartenant à la famille des carpes. Des informations sur les méthodes d'élevage et les soins à lui apporter se trouvent dans des manuels de référence sur les poissons tropicaux. Sa biologie et son utilisation dans la recherche liée à la pêche ont été passées en revue par Laale (1).

Ce poisson dépasse rarement 45 mm de longueur. Son corps cylindrique arbore 7 à 9 rayures horizontales bleu foncé et argentées. Ces rayures se prolongent dans les nageoires caudales et anales. Son dos est vert olive. Les mâles sont plus minces que les femelles. Les femelles sont plus argentées et leur abdomen est distendu, en particulier avant le frai.

Les poissons adultes sont capables de supporter de grandes fluctuations de température, de pH et de dureté. Toutefois, afin de disposer de poissons sains qui produisent des œufs de bonne qualité, il faut leur fournir des conditions optimales.

Pendant la parade nuptiale, le mâle poursuit la femelle et lui donne des coups de tête; les œufs sont fécondés dès qu'ils sont expulsés. Les œufs, qui sont transparents et non adhérents, tombent au fond où ils peuvent être mangés par les parents. Le frai est influencé par la lumière. Si la lumière du matin est suffisante, le poisson fraie habituellement au cours des premières heures qui suivent le lever du soleil.

Une femelle peut produire des pontes de plusieurs centaines d'œufs à des intervalles d'une semaine.

#### ÉTAT DES POISSONS PARENTS, REPRODUCTION ET PREMIERS STADES DE LA VIE

Un nombre adéquat de poissons sains est sélectionné et gardé dans une eau appropriée (voir à l'annexe 4, par exemple) pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Le groupe de poissons devrait s'être reproduit au moins une fois avant d'engendrer la série d'œufs utilisés dans l'essai. La densité des poissons durant cette période ne devrait pas excéder 1 gramme de poissons par litre. La densité pourra être plus élevée si l'eau est renouvelée régulièrement ou si on a recours à des systèmes de purification. La température des aquariums devrait être maintenue à  $25\text{ C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les poissons devraient recevoir un régime alimentaire varié, qui pourrait se composer, par exemple, d'aliments déshydratés appropriés trouvés dans le commerce, d'*Artemia* vivants récemment éclos, de chironomidés, de *Daphnia* et de vers blancs de la famille des enchytréidés.

Deux méthodes ayant permis d'obtenir un lot suffisant d'œufs fécondés sains, en vue de l'essai, sont résumées ci-dessous :

- i. Huit femelles et seize mâles sont placés dans un aquarium contenant 50 litres d'eau de dilution, protégé de la lumière directe. On évitera le plus possible de les perturber pendant au moins 48 heures. Un support de frai est disposé au fond de l'aquarium, pendant l'après-midi du jour qui précède le début de l'essai. Le support de frai se compose d'un cadre (en plexiglas ou dans un autre matériau adapté) de 5 à 7 cm de haut, muni d'un filet à grosses mailles (2- 5 mm) à son sommet et d'un filet à mailles fines (10- 30  $\mu\text{m}$ ) à sa base. Plusieurs "arbres à frai", consistant en une corde de nylon non torsadée, sont attachés au filet à grosses mailles du support. Après que les poissons ont été laissés dans l'obscurité pendant 12 heures, on allume une faible lumière qui va déclencher le frai. Deux à quatre heures après le frai, le support de frai est retiré et les œufs sont récupérés. Le support de frai empêchera les poissons de manger les œufs et facilitera en même temps la collecte des œufs. Le groupe de poissons devra avoir frayé au moins une fois avant le frai qui donnera les œufs destinés à l'essai.

- ii. Cinq à dix poissons mâles et femelles sont gardés dans des aquariums individuels pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Après cinq à dix jours, les abdomens des femelles seront distendus et leurs papilles génitales apparaîtront visiblement. Les poissons mâles n'ont pas de papilles. Le frai se déroule dans des cuves équipées d'un faux fond en filet (voir ci-dessus). La cuve est remplie d'eau de dilution jusqu'à une hauteur de 5 à 10 cm au-dessus du filet. Une femelle et deux mâles sont placés dans la cuve un jour avant le frai prévu. La température de l'eau est portée progressivement à un degré au-dessus de la température d'acclimatation. On éteint la lumière et on évite autant que possible toute perturbation aux poissons. Au matin, une faible lumière est allumée, qui déclenchera le frai. Après deux à quatre heures, les poissons sont enlevés et les œufs récoltés. Si le nombre d'œufs nécessaire dépasse la capacité de production d'une femelle, un nombre suffisant de cuves de frai peut être disposé en parallèle. En notant la capacité de reproduction de chaque femelle avant l'essai (taille de la ponte et qualité des œufs), on peut sélectionner les femelles qui possèdent la capacité de reproduction la plus avantageuse pour l'essai.

Les œufs doivent être transférés vers les récipients d'essai dans des tubes en verre (diamètre intérieur supérieur ou égal à 4 mm) dotés d'une poire aspirante souple. La quantité d'eau accompagnant les œufs lors de leur transfert devrait être aussi faible que possible. Les œufs sont plus denses que l'eau et tombent hors du tube. Il faut veiller à ce que les œufs (et les larves) n'entrent pas en contact avec l'air. On procédera à un examen microscopique d'un ou plusieurs échantillon(s) de ponte(s), pour vérifier s'il n'y a pas d'anomalies aux premiers stades de développement. La désinfection des œufs n'est pas autorisée.

Le taux de mortalité des œufs est le plus élevé dans les 24 heures qui suivent la fécondation. On observe souvent une mortalité de 5 à 40 pour cent durant cette période. Les œufs dégènèrent parce que la fécondation a échoué ou que le développement ne se déroule pas normalement. La qualité des œufs d'une ponte semble dépendre de la femelle, certaines femelles produisant systématiquement des œufs de bonne qualité, tandis que d'autres n'y arrivent jamais. La vitesse de développement et d'éclosion varie aussi d'une ponte à l'autre. Les œufs dont la fécondation s'est bien déroulée et les alevins présentent un taux de survie élevé, normalement supérieur à 90 pour cent. A 25° C, les œufs éclosent 3 à 5 jours après la fécondation et le sac vitellin est absorbé environ 13 jours après la fécondation.

Le développement embryonnaire a été bien caractérisé par Hisaoka et Battle (2). Grâce à la transparence des œufs et des larves écloses, il est possible de suivre le développement des poissons et d'observer la présence de malformations. Environ quatre heures après le frai, les œufs fécondés peuvent être distingués des œufs non fécondés (3). Les œufs et les larves sont placés dans des récipients d'essai de petit volume puis examinés au microscope.

Les conditions d'essai qui s'appliquent aux premiers stades de la vie sont énumérées à l'annexe 2. Les valeurs optimales pour le pH et la dureté de l'eau de dilution sont respectivement de 7,8 et de 250 mg de CaCO<sub>3</sub>/l.

### **CALCULS ET STATISTIQUES**

Une démarche en deux étapes est proposée. Tout d'abord, on procède à l'analyse statistique des données concernant la mortalité, les anomalies du développement et le moment de l'éclosion. Ensuite, on évalue statistiquement la longueur corporelle des poissons pour les concentrations auxquelles aucun effet nuisible n'a été détecté sur l'ensemble de ces trois premiers paramètres. Cette démarche est souhaitable étant donné que le produit toxique peut sélectivement tuer les plus petits poissons, retarder l'éclosion et induire des malformations évidentes, et par conséquent fausser les mesures de la longueur. En outre, il y aura à peu près le même nombre de poissons à mesurer par traitement, ce qui garantira la validité de l'analyse statistique de l'essai.

### DÉTERMINATIONS DE LA CL<sub>50</sub> ET DE LA CE<sub>50</sub>

Le pourcentage d'œufs et de larves survivants est calculé et corrigé en fonction de la mortalité chez les témoins à l'aide de la formule d'Abbott (4):

$$P = 100 - \left( \frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

où :

- P = pourcentage de survivants corrigé
- P' = pourcentage de survivants observé dans la concentration d'essai
- C = pourcentage de survivants chez les témoins

Si possible, la CL<sub>50</sub> devra être déterminée par une méthode appropriée à la fin de l'essai.

Si l'on souhaite intégrer les données relatives aux malformations morphologiques dans le traitement statistique de la CE<sub>50</sub>, on trouvera des indications à ce sujet dans l'article de Stephan (5).

### ESTIMATION DE LA CMEO ET DE LA CSEO

L'essai de toxicité aux stades de l'embryon et de l'alevin vise notamment à comparer les expériences menées à des concentrations non nulles avec les témoins, afin de déterminer la CMEO. Il y a donc lieu d'appliquer les méthodes de comparaisons multiples (6)(7)(8)(9)(10).

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. **10**, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., **102**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ANNEXE 2

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI, ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

ESPÈCE	TEMPÉRATURE (°C)	SALINITÉ (0/00)	PHOTO- PÉRIODE (h)	DURÉE DES STADES (jours)		DURÉE HABITUELLE DE L'ESSAI	SURVIE DES TÉMOINS (% MINIMUM)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
<b>EAU DOUCE</b>								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (8-10 jours)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel	10 ± 1 <sup>(1)</sup> 12 ± 1 <sup>(2)</sup>	–	0 <sup>(a)</sup>	30 – 35	25 – 30	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 20 jours après l'éclosion (50-55 jours)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	24 ± 1 <sup>(1)</sup> 23 ± 1 <sup>(2)</sup>	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (13-16 jours)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	60	70

<sup>(1)</sup>Pour les embryons      <sup>(2)</sup>Pour les larves

(a) Obscurité pour les embryons et les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion, sauf pendant qu'on les examine. Une lumière tamisée est ensuite appliquée jusqu'à la fin de l'essai.

**ANNEXE 3**

**CONDITIONS DE L'ESSAI, DURÉE ET CRITÈRES DE SURVIE POUR D'AUTRES ESPÈCES SUR LESQUELLES ON POSSÈDE UNE BONNE DOCUMENTATION**

ESPÈCE	TEMPÉRA-TURE (°C)	SALINITÉ (0/00)	PHOTO-PÉRIODE (h)	DURÉE DES STADES (jours)		DURÉE HABITUELLE DE L'ESSAI SUR L'EMBRYON ET L'ALEVIN	SURVIE DES TÉMOINS (% MINIMUM)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
<b>EAU DOUCE</b>								
<i>Carassius auratus</i> Cyprin doré	24 ± 1	-	-	3 – 4	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	-	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Crapet arlequin	21 ± 1	-	16	3	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	-	75
<b>EAU SALÉE</b>								
<i>Menidia peninsulae</i> Capucette nord-américaine	22 – 25	15 – 22	12	1.5	10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (6-7 jours)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Hareng	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (23-27 jours)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Morue	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (18 jours)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton	25 ± 1	15 – 30	12	-	-	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4/7 jours après l'éclosion (28 jours)	> 75	80

ANNEXE 4QUELQUES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Amoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l



## C.16. ABEILLE DOMESTIQUE, ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE

### 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice n° 213 de l'OCDE (1998).

#### 1.1 INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par voie orale des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes. Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par voie orale pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par voie orale vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante : essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques. Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

#### 1.2 DÉFINITIONS

**Toxicité aiguë par voie orale** : effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'administration d'une dose unique de la substance d'essai par voie orale.

**Dose** : quantité de substance d'essai consommée. La dose est exprimée en masse ( $\mu\text{g}$ ) de substance d'essai par animal testé ( $\mu\text{g}/\text{abeille}$ ). La dose réellement consommée par chaque abeille ne peut être calculée, étant donné que les abeilles sont nourries collectivement, mais il est possible d'estimer une dose moyenne (quantité totale de substance d'essai consommée/ nombre d'abeilles testées par cage).

**DL<sub>50</sub> (dose létale 50%) orale** : dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La DL<sub>50</sub> s'exprime en  $\mu\text{g}$  de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

**Mortalité** : un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

#### 1.3 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes (*Apis mellifera*) sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dispersée dans une solution de saccharose. Elles reçoivent ensuite la même alimentation, mais sans la substance d'essai. La mortalité est notée quotidiennement durant au moins 48 heures et comparée aux valeurs des témoins. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, tandis que la mortalité des témoins demeure à un niveau acceptable, c'est-à-dire  $\leq 10\%$ , il convient d'allonger la durée de l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. On analyse les résultats afin de calculer la DL<sub>50</sub> à 24 heures et à 48 heures et, si l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

#### 1.4 VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes :

- le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 pour cent à la fin de l'essai;
- la DL<sub>50</sub> de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

## 1.5 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### 1.5.1 Collecte des abeilles

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne, parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans une étuve et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc. ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant quatre semaines à partir de la fin du dernier traitement.

### 1.5.2 Conditions d'encagement et d'alimentation

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à une température de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ . L'humidité relative, comprise normalement entre 50 et 70 pour cent, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations et notamment le traitement et les observations peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). Les abeilles sont nourries avec une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume). Après que les doses d'essai ont été administrées, l'alimentation doit être fournie *ad libitum*. Le système d'alimentation doit permettre l'enregistrement de la prise de nourriture dans chaque cage (voir paragraphe 1.6.3.1). Un tube de verre (de quelque 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm) peut être utilisé.

### 1.5.3 Préparation des abeilles

Les abeilles récoltées sont réparties au hasard dans les cages d'essai qui, elles-mêmes, sont disposées au hasard dans la salle d'expérience.

Les abeilles peuvent être privées de nourriture pendant une durée maximale de 2 heures avant le début de l'essai. On recommande de faire jeûner les abeilles avant le traitement pour que le niveau de remplissage de leur tube digestif soit identique au début de l'essai. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

### 1.5.4 Préparation des doses

Si la substance d'essai est miscible dans l'eau, elle peut être dispersée directement dans une solution de saccharose à 50 pour cent. Pour les produits de qualité technique et les substances peu solubles dans l'eau, des véhicules tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple de l'acétone, du diméthylformamide, du diméthylsulfoxyde). La concentration du véhicule dépend de la solubilité de la substance d'essai et doit être identique pour toutes les concentrations testées. Cependant, il convient généralement d'appliquer une concentration de 1 % pour le véhicule et de ne pas la dépasser.

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées; autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés : une solution aqueuse et une solution de saccharose renfermant le solvant ou le véhicule à la même concentration que dans les solutions d'essai.

## 1.6 MODE OPÉRATOIRE

### 1.6.1 **Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testés par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la  $DL_{50}$ , avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement cinq doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la  $DL_{50}$ . Toutefois, le facteur de dilution et le nombre de concentrations du traitement doivent être déterminés en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les concentrations appropriées pour le dosage.

Il faut tester au moins trois groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai. Pas moins de trois groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Des séries de témoins devraient également être incluses pour les solvants ou les véhicules utilisés (voir paragraphe 1.5.4).

### 1.6.2 **Étalon de toxicité**

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins trois doses afin d'englober la valeur supposée de la  $DL_{50}$ . Chaque dose doit être testée dans au moins trois cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la  $DL_{50}$  par voie orale après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,35 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose-effet escomptée (par exemple le parathion).

### 1.6.3 **Exposition**

#### 1.6.3.1 *Administration des doses*

Il faut fournir à chaque groupe d'abeilles testé 100 à 200 µl d'une solution aqueuse de saccharose à 50 pour cent contenant la substance d'essai à la concentration appropriée. Il est nécessaire d'administrer un volume plus grand dans le cas des produits peu solubles, peu toxiques ou peu concentrés dans la préparation, étant donné qu'il faut utiliser des proportions plus élevées dans la solution de saccharose. La quantité de nourriture traitée consommée par groupe doit être surveillée. Une fois vidé (généralement en 3 à 4 heures), le tube contenant la solution alimentaire traitée doit être retiré de la cage et remplacé par un tube contenant une solution de saccharose pure. Les solutions de saccharose sont ensuite fournies *ad libitum*. Pour certains composés, la nourriture traitée avec des concentrations élevées peut être rejetée par les abeilles, si bien que la quantité de nourriture consommée risque d'être faible ou nulle. Après 6 heures au maximum, la nourriture traitée non consommée doit être remplacée par une solution de saccharose pure. La quantité de nourriture traitée consommée doit être évaluée (par exemple, en mesurant le volume ou le poids de la nourriture traitée restante).

#### 1.6.3.2 *Durée*

L'essai dure 48 heures après que la solution d'essai a été remplacée par une solution de saccharose pure. Si la mortalité continue de s'accroître de plus de 10 pour cent après les premières 24 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins n'excède pas 10 pour cent.

### 1.6.4 **Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après le début de l'essai et ensuite 24 heures et 48 heures après que la dose a été administrée. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 pour cent.

La quantité de solution alimentaire consommée par groupe doit être estimée. La comparaison entre les taux de consommation des solutions traitées et non traitées en l'espace de six heures peut donner une idée des qualités organoleptiques de la nourriture traitée.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

### 1.6.5 **Essai limite**

Dans certains cas (par exemple, lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté, avec 100 µg de substance active/abeille, afin de démontrer que la  $DL_{50}$  est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les trois groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires, l'évaluation de la quantité de nourriture traitée consommée et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir paragraphe 1.6.4), il faut les noter.

## 2 **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### 2.1 **RÉSULTATS**

Les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai, ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 h, 48 h, et, si nécessaire, 72 h, 96 h) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50% ( $DL_{50}$ ) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). Lorsque la nourriture traitée n'est pas complètement consommée, la dose de la substance d'essai consommée par groupe doit être déterminée. La  $DL_{50}$  doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

### 2.2 **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.2.1 **Substance d'essai :**

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur) ;
- données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

#### 2.2.2 **Espèce d'expérience :**

- nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte ;
- informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

#### 2.2.3 **Conditions d'essai :**

- température et humidité relative de la salle d'expérience ;
- conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages ;
- méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai (le solvant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant) ;
- conception de l'essai, par exemple: nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins ; pour chaque concentration d'essai et témoin : nombre de cages et nombre d'abeilles par cage ;
- date de l'essai.

#### 2.2.4 **Résultats :**

- résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant ;
- données brutes : mortalité à chaque dose testée et à chaque temps d'observation ;
- courbes dose- effet à la fin de l'essai ;
- valeurs de la DL<sub>50</sub> avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité ;
- méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL<sub>50</sub> ;
- mortalité chez les témoins ;
- autres effets biologiques observés ou mesurés; par exemple, comportement anormal des abeilles (y compris rejet de la dose d'essai), vitesse de consommation de la nourriture dans les groupes traités et non traités ;
- tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

### 3. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) EPPO/Council of Europe. Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J, McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera L.*) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. et Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New- York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

## C.17. ABEILLE DOMESTIQUE, ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT

### 1 METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice n° 214 de l'OCDE (1998).

#### 1.1 INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par contact des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par contact pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par contact vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante : essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

#### 1.2 DÉFINITIONS

**Toxicité aiguë par contact** : effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'application locale d'une dose unique de la substance d'essai.

**Dose** : quantité de substance d'essai appliquée. La dose est exprimée en masse ( $\mu\text{g}$ ) de substance d'essai par animal testé ( $\mu\text{g}$ /abeille).

**DL<sub>50</sub> (dose létale 50 %) par contact** : dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par contact. La DL<sub>50</sub> est exprimée en  $\mu\text{g}$  de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

**Mortalité** : un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

#### 1.3 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dissoute dans un véhicule approprié, par application directe sur le thorax (aérosol). L'essai dure 48 heures. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, alors que la mortalité des témoins reste à un niveau acceptable, c'est-à-dire  $\leq 10\%$ , il convient de prolonger l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. La mortalité est notée tous les jours et comparée avec les valeurs des témoins. On analyse les résultats afin de calculer la DL<sub>50</sub> à 24 heures et à 48 heures et, au cas où l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

#### 1.4 VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes :

- le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai;
- la DL<sub>50</sub> de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

## 1.5 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### 1.5.1 Collecte des abeilles

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne, parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans un incubateur et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antiviroles, etc. ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant quatre semaines à partir de la fin du dernier traitement.

### 1.5.2 Conditions d'encagement et d'alimentation

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est à dire leur fournir un espace suffisant. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ . L'humidité relative, généralement comprise entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations et notamment le traitement et les observations peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). La nourriture se compose d'une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume), fournie *ad libitum* durant toute la durée de l'essai à l'aide d'une mangeoire pour abeilles. Celle-ci peut consister en un tube de verre (d'environ 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm).

### 1.5.3 Préparation des abeilles

Les abeilles récoltées peuvent être anesthésiées avec du dioxyde de carbone ou de l'azote en vue de l'application de la substance d'essai. La quantité d'anesthésiant utilisée et la durée de l'exposition doivent être réduites au minimum. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

### 1.5.4 Préparation des doses

La substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution dans un véhicule, à savoir un solvant organique ou de l'eau avec un agent mouillant. Parmi les solvants organiques, on préfère l'acétone, mais d'autres solvants organiques peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde). Dans le cas des préparations chimiques dispersées dans l'eau et des substances organiques fortement polaires non solubles dans les solvants organiques, les solutions peuvent être plus faciles à appliquer si elles sont préparées dans une solution faible d'un agent mouillant commercial (par exemple, Agral, Citowett, Lubrol, Triton, Tween).

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées; autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés, l'un étant traité avec de l'eau et l'autre avec le solvant ou le dispersant.

## 1.6 MODE OPÉRATOIRE

### 1.6.1 **Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testés par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL<sub>50</sub>, avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement cinq doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL<sub>50</sub>. Toutefois, le nombre de doses doit être déterminé en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les doses appropriées.

Il faut tester au moins trois groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai.

Pas moins de trois groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Si on utilise un solvant organique ou un agent mouillant, trois groupes supplémentaires de 10 abeilles chacun doivent être inclus pour le solvant ou l'agent mouillant.

### 1.6.2 **Étalon de toxicité**

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins trois doses afin d'englober la valeur supposée de la DL<sub>50</sub>. Chaque dose doit être testée dans au moins trois cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL<sub>50</sub> par contact après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,30 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose-effet escomptée (par exemple le parathion).

### 1.6.3 **Exposition**

#### 1.6.3.1 *Administration des doses*

Les abeilles anesthésiées sont traitées individuellement par application locale. Les abeilles sont réparties au hasard entre les groupes traités aux différentes doses et les groupes témoins. Un volume de 1 µl de solution contenant la substance d'essai à la concentration appropriée doit être appliqué à l'aide d'un micro-applicateur sur la face dorsale du thorax de chaque abeille. D'autres volumes peuvent être utilisés si cela se justifie. Après l'application, les abeilles sont réparties entre les cages d'essai dans lesquelles on distribue une solution de saccharose.

#### 1.6.3.2 *Durée*

L'essai dure 48 heures. Si la mortalité augmente de plus de 10 % entre 24 heures et 48 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

### 1.6.4 **Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après l'application de la dose, puis 24 heures et 48 heures après celle-ci. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures pendant 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

### 1.6.5 **Essai limite**

Dans certains cas (par exemple lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté, avec 100 µg de substance active/abeille, afin de démontrer que la DL<sub>50</sub> est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les trois groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir paragraphe 1.6.4), il faut les noter.



## 2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### 2.1 **RÉSULTATS**

Les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai, ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 h, 48 h, et, si nécessaire, 72 h, 96 h) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50% ( $DL_{50}$ ) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). La  $DL_{50}$  doit être exprimée en  $\mu\text{g}$  de substance d'essai par abeille.

### 2.2 **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.2.1 **Substance d'essai :**

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur) ;
- données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

#### 2.2.2 **Espèce d'expérience :**

- nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte ;
- informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

#### 2.2.3 **Conditions d'essai :**

- température et humidité relative de la salle d'expérience ;
- conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages ;
- modalités d'administration de la substance d'essai, par exemple solvant utilisé, volume de solution d'essai appliqué, anesthésiants utilisés ;
- conception de l'essai, par exemple nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin : nombre de cages et nombre d'abeilles par cage ;
- date de l'essai.

#### 2.2.4 **Résultats :**

- résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant ;
- données brutes : mortalité à chaque concentration testée et à chaque temps d'observation ;
- courbes dose-effet à la fin de l'essai ;
- valeurs de la  $DL_{50}$  avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité ;
- méthodes statistiques utilisées pour calculer la  $DL_{50}$ ;
- mortalité chez les témoins ;
- autres effets biologiques observés et toute réaction anormale des abeilles ;
- tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) EPPO/Council of Europe. Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol 23, N.1, 151-165. March, 1993.
- (2) Gough, H. J, McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera L.*),1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. et Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

**C.18. DETERMINATION DE L'ADSORPTION/DESORPTION  
AU MOYEN DE LA METHODE PAR AGITATION**

**1. METHODE**

La méthode décrite reprend la ligne directrice n. 106 de l'OCDE sur l'adsorption/désorption dans les sols fondée sur la méthode par agitation (2000).

**1.1 INTRODUCTION**

La méthode s'inspire d'un test circulaire, d'un séminaire sur la sélection des sols pour le développement d'un essai d'adsorption (1)(2)(3)(4) et de certaines lignes directrices nationales (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Les études d'adsorption/désorption donnent des informations précieuses sur la mobilité des substances chimiques et leur répartition dans les trois compartiments de la biosphère (lithosphère, hydrosphère, atmosphère) (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Ces informations servent à prédire et à évaluer certaines caractéristiques d'une substance: la capacité de dégradation (22)(23), de transformation et d'absorption par les organismes (24), la lixiviation à travers le sol (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), la volatilité à partir du sol (21)(29)(30), le ruissellement à la surface du sol vers les eaux naturelles (18)(31)(32). Les données sur l'adsorption peuvent être utilisées à des fins de comparaison ou de modélisation (19)(33)(34)(35).

La distribution d'une substance chimique entre les phases solides et aqueuses est un processus complexe qui dépend d'un grand nombre de facteurs: nature chimique de la substance (12)(36)(37)(38)(39)(40), caractéristiques du sol (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49), mais aussi des conditions climatiques: précipitations, température, ensoleillement, vent. La méthode présentée ici, qui est un modèle de laboratoire simplifié, ne permet pas d'expliquer entièrement les phénomènes et les mécanismes impliqués dans l'adsorption d'une substance chimique par le sol. Mais si elle n'est pas exhaustive, elle donne tout de même d'utiles informations sur les effets environnementaux de l'adsorption d'un produit chimique.

Voir également l'introduction générale.

**1.2 OBJET DE LA METHODE**

La méthode vise à évaluer le comportement d'adsorption/désorption d'une substance dans les sols. Il s'agit d'obtenir une valeur de sorption permettant de prédire le partage d'une substance sous diverses conditions environnementales. Les coefficients d'adsorption à l'équilibre d'une substance chimique sur différents sols sont déterminés en fonction des caractéristiques du sol (e.g. teneur en carbone organique, teneur en argile, texture, pH). Il faut utiliser plusieurs types de sols pour couvrir le plus grand nombre possible d'interactions d'une substance donnée avec des sols naturels.

La présente méthode considère l'adsorption comme la liaison d'une substance chimique à la surface des sols. Elle ne fait pas de distinction entre les différents processus d'adsorption (adsorption physique et chimique) et d'autres processus tels que la dégradation catalysée par la surface, l'adsorption de masse ou la réaction chimique. Elle ne tient pas compte de l'adsorption sur les particules colloïdales (diamètre < 0.2 µm) générées par les sols.

Les paramètres considérés comme les plus importants pour l'adsorption sont: la teneur en carbone organique (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), la teneur en argile, la texture (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48), le pH (pour les composés ionisables) (3)(4)(42). D'autres sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'adsorption : la capacité d'échange cationique réelle (CECR), la teneur en fer amorphe et en oxydes d'aluminium, notamment dans le cas des sols volcaniques et tropicaux (4), ainsi que la surface spécifique (49).

L'essai permet d'évaluer l'adsorption d'une substance chimique sur des sols de texture et de pH différents et n'ayant pas la même teneur en carbone organique et en argile. Il comprend trois phases:

**Phase 1:** Étude préliminaire servant à déterminer:

- le rapport sol/solution;
- le temps d'équilibre de l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre;
- l'adsorption de la substance sur la surface des récipients d'essai et la stabilité de la substance durant l'essai.

**Phase 2:** Essai de sélection: l'adsorption est étudiée sur cinq sols différents. On détermine la cinétique d'adsorption avec une concentration unique, ainsi que le coefficient de distribution  $K_d$  et  $K_{oc}$ .

**Phase 3:** Détermination des isothermes d'adsorption de Freundlich: cet essai sert à évaluer l'effet de la concentration sur le degré d'adsorption sur les sols.

Étude de la désorption par l'évaluation de la cinétique et des isothermes de désorption de Freundlich (annexe 1).

1.3

#### DEFINITIONS ET UNITES

Symbole	Définition	Unités
$A_{t_i}$	pourcentage d'adsorption au temps $t_i$	%
$A_{eq}$	pourcentage d'adsorption à l'équilibre	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'instant $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(eq)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g}$
$M_0$	masse de substance dans le tube au début de l'essai	$\mu\text{g}$
$m_m^{ads}(t_i)$	masse de substance mesurée dans une aliquote $v_a^A$ au temps $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g}$
$m_{sol}$	quantité de phase de sol exprimée en masse sèche du sol	g
$C_{st}$	concentration massique de la solution de réserve	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_0$	concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps $t_i$ , lorsque l'analyse est effectuée	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads} (eq)$	Concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads} (eq)$	Concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_0$	volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai d'adsorption	$\text{cm}^3$
$v_a^A$	volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée	$\text{cm}^3$
$K_d$	coefficient de répartition de l'adsorption	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{oc}$	coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{om}$	coefficient de la répartition normalisé basé sur la teneur en matière organique	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{ads}$	coefficient d'adsorption de Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	exposant de Freundlich	
$D_{t_i}$	pourcentage de désorption à l'instant $t_i$	%
$D_{\Delta t_i}$	pourcentage de désorption durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$	%
$K_{des}$	coefficient de désorption apparente	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{des}$	coefficient de désorption de Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des} (t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_m^{des} (eq)$	masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des} (eq)$	masse totale de substance désorbée à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g}$
$m_s^{des} (\Delta t_i)$	masse de substance restant adsorbée sur le sol après l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^A$	masse de substance résiduelle après atteinte de l'équilibre d'adsorption due à un volume de remplacement insuffisant	$\mu\text{g}$
$C_s^{des} (eq)$	concentration de la substance restant adsorbée dans le sol à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des} (eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_T$	volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	$\text{cm}^3$
$V_R$	volume de sumageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume identique d'une solution de 0,01 M de $\text{CaCl}_2$	$\text{cm}^3$
$v_a^D$	volume de l'aliquote extrait du tube (i) pour analyse lors de l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	$\text{cm}^3$
$V_{\Gamma}^i$	volume de solution extrait du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (méthode parallèle)	$\text{cm}^3$

$V_r^F$	volume de solution extrait du tube afin de mesurer la substance à l'équilibre de désorption	$\text{cm}^3$
MB	bilan matière	%
$m_E$	masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du tube d'essai	$\mu\text{g}$
$V_{\text{rec}}$	volume de surnageant récupéré après l'équilibre d'adsorption	$\text{cm}^3$
$P_{\text{ow}}$	coefficient de partage octanol/eau	
pKa	constante de dissociation	
$S_w$	solubilité dans l'eau	$\text{g l}^{-1}$

#### 1.4 PRINCIPE DE LA METHODE

Des volumes connus de la substance, non marquée ou radiologiquement marquée, mélangée à des concentrations connues de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sont ajoutés à des échantillons de sol d'un poids sec connu, préalablement équilibrés dans du  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. Le mélange est agité pendant le temps requis. Les particules du sol en suspension sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration, puis la phase aqueuse est analysée. La quantité de substance adsorbée sur le sol correspond à la différence entre la quantité de substance initialement présente dans la solution et la quantité restant à la fin de l'expérience (méthode indirecte).

La quantité de substance adsorbée peut également être directement calculée par l'analyse du sol (méthode directe). Cette méthode, qui consiste à extraire progressivement le sol au moyen d'un solvant approprié, est recommandée lorsque l'on ne peut pas déterminer avec précision les écarts de concentration de la substance dans la solution, par exemple dans les cas suivants: adsorption de la substance sur la surface des tubes d'essai, instabilité de la substance au cours de l'expérience, faible adsorption modifiant peu la concentration de la substance dans la solution, forte adsorption entraînant une faible concentration ne pouvant être mesurée avec précision. L'utilisation d'une substance radioactivement marquée permet d'éviter d'extraire le sol. On analyse dans ce cas la phase du sol par combustion et comptage à scintillation liquide. Cette dernière méthode, non spécifique, ne permet cependant pas de distinguer les produits primaires des produits de transformation. Elle ne devrait donc être utilisée que si la substance à tester reste stable pendant toute la durée de l'étude.

#### 1.5 INFORMATION SUR LA SUBSTANCE

Les réactifs chimiques doivent être purs. On recommande l'emploi de substances non marquées de composition connue et présentant de préférence un degré de pureté d'au moins 95 % ou de substances radioactivement marquées de composition connue et radioactivement pures. Il faut appliquer des corrections pour tenir compte de la désintégration lorsque l'on emploie des traceurs à demi-vie courte.

Les paramètres suivants doivent être connus avant de réaliser un essai d'adsorption/désorption:

- a) solubilité dans l'eau (A.6.);
- b) pression de vapeur (A.4.) et/ ou constante de la loi d'Henry;
- c) dégradation non biologique: hydrolyse en fonction du pH (C.7.);
- d) coefficient de partage (A.8.);
- e) biodégradabilité facile (C.4.) ou transformation aérobie et anaérobie dans le sol;
- f) pKa des substances ionisables;
- g) photolyse directe dans l'eau (i.e. spectre d'absorption UV-Vis dans l'eau, rendement quantique, p. ex.) et photodégradation sur le sol.

## 1.6 APPLICABILITE DE L'ESSAI

L'essai est applicable aux substances chimiques pour lesquelles on dispose d'une méthode analytique suffisamment précise. La stabilité de la substance durant l'essai est un paramètre important qui peut influencer la fiabilité des résultats, notamment avec la méthode indirecte. Il faut donc vérifier la stabilité par une étude préliminaire. Si l'on observe une transformation durant l'essai, il est recommandé d'analyser le sol et les phases aqueuses lors de l'étude principale.

Des difficultés peuvent survenir avec des substances faiblement solubles dans l'eau ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ) ou avec des substances fortement chargées du fait que la concentration de la phase aqueuse ne peut pas être mesurée avec suffisamment de précision avec la méthode analytique. Il faut prendre d'autres mesures dans ces cas. Les moyens d'aborder ces problèmes sont traités dans les chapitres correspondants.

Il faut veiller à éviter les pertes si l'on analyse des substances volatiles.

## 1.7 MODE OPERATOIRE

### 1.7.1 Appareillage, réactifs chimiques

Le laboratoire doit être équipé de l'équipement standard suivant:

- a) Tubes ou récipients d'essai. Il est important qu'ils soient:
  - adaptés à la centrifugeuse afin de diminuer les erreurs de manipulation et de transfert;
  - constitués d'un matériau inerte qui diminue l'adsorption de la substance sur les parois.
- b) Agitateur: agitateur vertical ou équipement équivalent; le sol doit être maintenu en suspension pendant l'agitation.
- c) Centrifugeuse: elle doit être de préférence à vitesse de rotation élevée (forces de centrifugation  $> 3000g$ , p. ex.), à température contrôlée et capable d'éliminer de la solution aqueuse les particules d'un diamètre supérieur à  $0.2 \mu\text{m}$ . Les récipients doivent être fermés durant l'agitation et la centrifugation afin d'éviter les pertes par volatilité et les pertes en eau; il est recommandé d'utiliser des couvercles désactivés (couvercles filetés recouverts de téflon, p. ex.) afin de diminuer l'adsorption sur leur surface.
- d) Équipement facultatif: filtres stériles jetables d'une porosité de  $0.2 \mu\text{m}$ . Le matériau filtrant doit être choisi avec soin afin d'éviter l'adsorption de la substance à sa surface; les filtres organiques sont déconseillés pour les substances peu solubles.
- e) Instrumentation analytique permettant de mesurer la concentration de la substance.
- f) Four de laboratoire permettant de maintenir une température de  $103 \text{ C}$  à  $110 \text{ C}$ .

### 1.7.2 Caractérisation et sélection des sols

Les sols doivent être caractérisés par les trois paramètres principalement responsables de la capacité d'adsorption: le carbone organique, la teneur en argile et la texture, le pH. Comme nous l'avons dit plus haut (voir le chapitre "Objet de la méthode"), d'autres caractéristiques physico-chimiques peuvent influencer sur l'adsorption/désorption d'une substance et elles doivent donc être prises en compte.

Les méthodes de caractérisation des sols revêtent une extrême importance car elles peuvent influencer les résultats de manière significative. Il est donc recommandé de mesurer le pH du sol dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (la solution utilisée lors de l'essai d'adsorption/désorption) selon la méthode ISO correspondante (ISO-10390-1). Il est également conseillé de déterminer certaines autres propriétés du sol selon les méthodes standard (par exemple manuel ISO de l'analyse des sols Handbook of Soil Analysis). On peut ainsi faire reposer l'analyse des données relatives à la sorption sur des paramètres de sol harmonisés. La bibliographie donne quelques références de méthodes harmonisées d'analyse et de caractérisation des sols (50-52). L'utilisation de sols de référence est recommandée pour calibrer les méthodes d'essai des sols.

Le tableau I indique comment choisir les sols pour les essais d'adsorption/désorption. Les sept types de sols choisis se rencontrent dans des zones géographiques tempérées. Pour les substances ionisables, les sols sélectionnés doivent couvrir un large spectre de pH pour permettre d'évaluer l'adsorption de la substance sous sa forme ionisée et non ionisée. Le chapitre 1.9 ("Réalisation de l'essai") indique combien de sols différents doivent être utilisés durant les diverses phases de l'essai.

Si d'autres types de sols sont choisis, il faut les caractériser au moyen des mêmes paramètres et ils doivent présenter des propriétés aussi diverses que celles décrites dans le tableau 1, même s'ils ne remplissent pas tout à fait les critères.

**Tableau 1: aide à la sélection des échantillons de sol pour les essais d'adsorption-désorption**

Type de sol	pH (dans le CaCl <sub>2</sub> 0,01 M)	Teneur en carbone organique (%)	Teneur en argile (%)	Texture du sol
1	4.5 - 5.5	1.0 - 2.0	65 - 80	argile
2	> 7.5	3.5 - 5.0	20 - 40	limon-argileux
3	5.5 - 7.0	1.5 - 3.0	15 - 25	limons fins
4	4.0 - 5.5	3.0 - 4.0	15 - 30	limon
5	< 4.0 - 6.0 <sup>§</sup>	< 0.5 - 1.5 <sup>‡</sup>	< 10 - 15 <sup>§</sup>	sable-limoneux
6	> 7.0	< 0.5 - 1.0 <sup>‡</sup>	40 - 65	Limon-argileux / argile
7	< 4.5	> 10	< 10	sable/sable glaiseux

\* Selon la FAO et le système américain (85)

§ Les valeurs des variables doivent être comprises de préférence dans les limites du spectre indiqué. En cas de difficulté à trouver un sol approprié, des valeurs inférieures au minimum indiqué sont acceptées.

‡ Les sols contenant moins de 0.3% de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en carbone organique et l'adsorption. Il est donc recommandé d'utiliser des sols présentant une teneur supérieure à 0.3%.

### 1.7.3 Collecte et stockage des échantillons de sols

#### 1.7.3.1 Collecte

Aucune technique ou instrument d'échantillonnage particulier n'est recommandée; la technique d'échantillonnage dépend des objectifs de l'étude (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Il convient de considérer les aspects suivants:

- il faut disposer d'informations détaillées sur le site d'essai: localisation, couverture végétale, traitement aux pesticides et/ou aux engrais, adjuvants biologiques ou contamination accidentelle. Le site doit être décrit selon les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6).



- b) le site d'échantillonnage doit être défini par l'UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ou par des coordonnées géographiques, de manière à pouvoir reconnaître ultérieurement un sol particulier ou à définir un sol en fonction des divers systèmes de classification utilisés dans les différents pays. Il est également recommandé de prélever dans l'horizon A jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm. Si un horizon  $O_h$  est présent dans le sol n. 7 en particulier, il doit être inclus dans l'échantillon.

Les échantillons sont transportés dans des conteneurs et dans des conditions thermiques propres à préserver au mieux les propriétés initiales du sol.

#### 1.7.3.2 *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols fraîchement prélevés. Si cela n'est pas possible, le sol peut être stocké à la température ambiante et maintenu au sec. Aucun temps de stockage maximal n'est recommandé, mais au-delà de trois ans, les sols doivent être à nouveau analysés avant l'emploi afin de vérifier leur teneur en carbone organique, leur pH et leur C.E.C.

#### 1.7.3.3 *Manipulation et préparation des échantillons d'essai*

Les sols sont séchés à l'air à la température ambiante (de préférence entre 20 à 25 °C). Ils sont désagrégés en appliquant des forces minimales de manière à modifier aussi peu que possible la texture originale, puis tamisés pour ne conserver que les particules  $\leq 2$  mm. Le tamisage doit respecter les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6). Une bonne homogénéisation est recommandée car elle améliore la reproductibilité des résultats. La teneur en eau de chaque sol est déterminée à partir de trois aliquotes par un réchauffement à 105 °C jusqu'à stabilisation du poids (environ 12h). Pour tous les calculs, la masse du sol se réfère à la masse sèche à l'étuve, c'est-à-dire au poids de sol diminué de la teneur en eau.

#### 1.7.4 **Préparation de la substance d'essai devant être appliquée sur le sol**

La substance d'essai est dissoute dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée; la solution de  $\text{CaCl}_2$  est utilisée comme solvant aqueux pour améliorer la centrifugation et diminuer les échanges de cations. La concentration de la solution mère doit être supérieure de 3 ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode d'analyse utilisée. Ce seuil permet de faire des mesures précises avec la méthodologie employée lors de l'essai. Enfin, la concentration de la solution de réserve doit être inférieure à la solubilité dans l'eau de la substance.

Il est conseillé de préparer la solution de réserve immédiatement avant de l'appliquer sur le sol et de la conserver dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à une température de 4 °C. La durée de stockage dépend de la stabilité de la substance et de sa concentration dans la solution.

Un agent solubilisant peut être utilisé pour les substances peu solubles ( $S_w < 10^{-4}$  g l<sup>-1</sup>) qui se dissolvent difficilement. Il doit être miscible avec l'eau, comme le méthanol ou l'acétonitrile; sa concentration ne doit pas dépasser 1% du volume total de la solution de réserve et elle doit être inférieure à celle de la substance dans la solution qui entrera en contact avec le sol (de préférence moins de 0.1%); il ne doit pas être un surfactant ou subir des réactions solvolytiques avec la substance d'essai. Le procès-verbal d'essai doit indiquer qu'un tel agent a été employé et en donner les raisons.

Un autre moyen de traiter les substances peu solubles consiste à introduire la substance d'essai dans le système d'essai à l'aide d'un solvant auxiliaire : la substance est dissoute dans un solvant organique, dont une fraction est ajoutée au système constitué par le sol et par une solution 0,01M de CaCl<sub>2</sub> dans de l'eau distillée ou désionisée. La concentration du solvant organique dans la phase aqueuse devrait être aussi faible que possible et ne pas excéder en principe 0,1 pour cent. L'expérimentateur devra toutefois tenir compte du fait que l'introduction de la substance à l'aide d'une solution organique est susceptible de nuire à la reproductibilité des volumes. La concentration de la substance d'essai et du solvant auxiliaire risquent donc de varier légèrement entre les essais et d'introduire une erreur supplémentaire.

## 1.8 CONDITIONS PREALABLES A LA REALISATION DE L'ESSAI D'ADSORPTION/DESORPTION

### 1.8.1 Méthode analytique

Un certain nombre de paramètres peuvent influencer la précision des mesures: la précision de la méthode d'analyse de la solution et des phases adsorbées, la stabilité et la pureté de la substance, le temps pour atteindre l'équilibre de sorption, l'étendue des variations de concentration de la solution, le rapport sol/solution et les modifications de la structure du sol au cours du processus d'équilibrage (35)(59-62). L'annexe 2 donne quelques exemples à ce propos.

La fiabilité de la méthode d'analyse doit être vérifiée selon la gamme de concentration susceptible d'être celle rencontrée durant l'essai. L'expérimentateur est libre d'élaborer une méthode appropriée présentant toutes les qualités requises en matière de précision, d'exactitude, de reproductibilité, de limites de détection et de récupération. L'expérience ci-dessous montre comment effectuer un tel essai.

Un volume approprié de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (100 cm<sup>3</sup> p. ex.), est agité pendant 4 h avec un certain poids de sol (20 g, p. ex.) hautement adsorbant, c'est-à-dire riche en carbone organique et en argile. Le poids et le volume varient selon les besoins de l'analyse mais un rapport sol/solution de 1:5 constitue un bon point de départ. Le mélange est centrifugé et la phase aqueuse filtrée. Une partie de la solution de réserve de la substance est ajoutée à cette dernière afin d'obtenir une concentration nominale comprise dans la gamme de concentration correspondant à celle de l'essai. Ce volume ne doit pas excéder 10% du volume final de la phase aqueuse afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de pré-équilibre. La solution est ensuite analysée.

Un témoin constitué du système du sol et de la solution de CaCl<sub>2</sub> (sans substance d'essai) doit être ajouté afin de vérifier les artefacts de la méthode d'analyse et les effets de matrice induits par le sol.

La chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectrométrie (CG/spectrométrie de masse, HPLC /spectrométrie de masse) et le comptage à scintillation liquide (pour les substances radiologiquement marquées) figurent parmi les méthodes de mesure de la sorption. Un taux de récupération de 90 à 110 % de la valeur nominale est jugé satisfaisant quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. La limite de détection de la méthode d'analyse doit être d'au moins de deux ordres de grandeur inférieure à la concentration nominale afin de permettre la détection et l'évaluation une fois que le partage est effectué.

Les caractéristiques et la limite de détection de la méthode utilisée pour effectuer les études d'adsorption déterminent les conditions d'essai et les résultats expérimentaux. La méthode présentée ici suit un protocole expérimental général et propose des solutions de rechange lorsque la méthode analytique ou les équipements de laboratoire imposent des limites.

### Choix de rapports sol/solution optimums

Les rapports sol/solution appropriés à l'étude de la sorption sont choisis en fonction du coefficient de répartition  $K_d$  et du degré relatif d'adsorption souhaité. Le changement de la concentration de la substance dans la solution détermine la précision statistique de la mesure, fondée sur la forme de l'équation d'adsorption et sur la limite de la méthode d'analyse, ainsi que l'exactitude avec laquelle elle permettra de détecter la substance contenue dans la solution. Il est donc utile de déterminer plusieurs rapports fixes présentant un pourcentage adsorbé supérieur à 20 % ou, de préférence, à 50 % (62), tout en veillant à ce que la concentration de la substance dans la phase aqueuse reste suffisamment élevée pour pouvoir être mesurée avec précision, notamment lorsque les pourcentages d'adsorption sont importants.

Une solution pratique consiste à choisir les rapports sol/solution en estimant la valeur du coefficient de répartition  $K_d$  lors d'études préliminaires ou par des techniques d'estimation bien établies (voir l'annexe 3). On peut ensuite porter sur un graphique le rapport sol/solution en fonction du coefficient de distribution pour différents pourcentages fixes d'adsorption (fig.1). Dans le graphique ci-dessous, on estime que l'équation d'adsorption est linéaire<sup>1</sup>. La relation est obtenue en réécrivant l'équation (4) du  $K_d$  sous la forme suivante (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left( \frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

ou sous sa forme logarithmique, en supposant que  $R = m_{\text{soil}}/V_0$  et  $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$  :

$$\log R = - \log K_d + \log \left[ \frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$

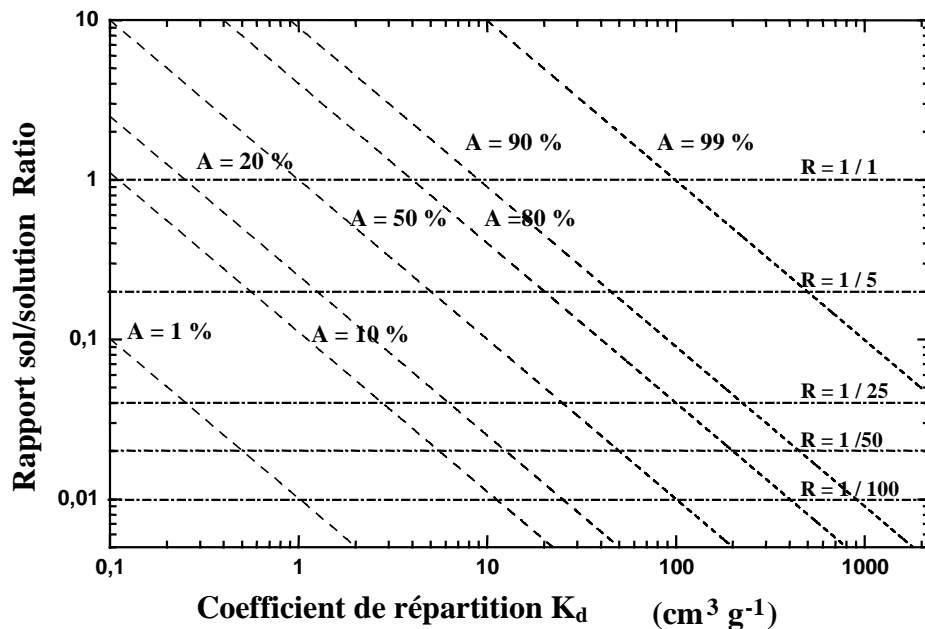


Fig. 1 Relation entre les rapports sol/solution et  $K_d$  pour différents pourcentages d'adsorption de la substance

<sup>1</sup>  $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

La figure 1 montre le rapport sol/solution requis en fonction de  $K_d$  pour divers niveaux d'adsorption. Par exemple, avec un rapport sol/solution de 1:5 et un  $K_d$  de 20, l'adsorption serait de 80% environ. Pour obtenir un pourcentage d'adsorption de 50% avec le même  $K_d$ , il faudrait un rapport de 1:25. Cette méthode souple permet de choisir les rapports sol/solution en fonction des besoins de l'expérience.

Les zones où la substance est très fortement ou très légèrement adsorbée sont plus difficiles à maîtriser. En cas de faible absorption, un rapport sol/solution de 1:1 est recommandé, mais des ratios plus faibles peuvent être nécessaires avec certains types de sols très organiques afin d'obtenir une boue. Avec la méthode analytique, il faut veiller à mesurer les légères variations de concentration de la substance, faute de quoi la mesure d'adsorption sera inexacte. Avec un coefficient de distribution  $K_d$  très élevé, on peut aller jusqu'à un rapport de 1:100 de manière à conserver une quantité importante de substance en solution. Il faut cependant bien mélanger et donner au système le temps de s'équilibrer. On peut aussi prédire la valeur  $K_d$  au moyen de techniques d'estimation fondées par exemple sur la valeur  $P_{ow}$  (voir l'annexe 3). Cette méthode peut être utile pour les substances chimiques polaires ou faiblement adsorbées ayant un  $P_{ow} < 20$  et pour les substances lipophiles ou fortement sorbantes dotées d'un  $P_{ow} > 10^4$ .

## 1.9 REALISATION DE L'ESSAI

### 1.9.1 Conditions de l'essai

Les essais sont réalisés à température ambiante et, si possible, à une température constante comprise entre 20 et 25 °C.

La centrifugation doit permettre d'éliminer de la solution les particules supérieures à 0.2  $\mu\text{m}$ . Cette valeur correspond à la plus petite particule considérée comme une particule solide et constitue la limite entre les particules solides et les colloïdes. L'annexe 4 explique comment déterminer les paramètres de la centrifugation.

Si l'équipement de centrifugation ne permet pas d'éliminer à coup sûr les particules supérieures à 0.2  $\mu\text{m}$ , on peut combiner la centrifugation et la filtration avec des filtres de 0.2  $\mu\text{m}$ . Ces filtres doivent être fabriqués en matériau inerte afin d'éviter les pertes de substance. Il faut dans tous les cas apporter la preuve qu'il n'y a aucune perte de substance au cours de la filtration.

### 1.9.2 Phase 1- Étude préliminaire

Le but de l'étude préliminaire a déjà été expliqué dans le chapitre "Objet de la méthode". La réalisation de l'essai est exposée ci-après.

#### 1.9.2.1 Sélection de rapports sol/solution optimums

On utilise deux types de sols et trois rapports sol/solution (six essais). Un sol a une teneur en carbone organique élevée et une faible teneur en argile, l'autre une faible teneur en carbone organique et une teneur élevée en argile. Les rapports suivants sont proposés:

-50 g de sol et 50  $\text{cm}^3$  de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:1);

-10 g de sol et 50  $\text{cm}^3$  de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:5);

-2 g de sol et 50  $\text{cm}^3$  de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:25).

La quantité minimale de sol qui va servir à l'expérience dépend de l'équipement de laboratoire dont on dispose et des performances des méthodes analytiques utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser au moins 1 g, de préférence 2 g, afin d'obtenir des résultats d'essai fiables.

Un échantillon de contrôle contenant uniquement la substance d'essai dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans sol) est soumise exactement aux mêmes opérations que le système d'essai afin de vérifier la stabilité de la substance dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  et son adsorption éventuelle à la surface des récipients d'essai.

Un témoin par sol contenant la même quantité de sol dans un volume total de  $50 \text{ cm}^3$  de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans substance) est soumis à la même procédure d'essai. Il permet de détecter les substances étrangères ou les sols contaminés.

Tous les essais, contrôles et témoins sont réalisés au moins en double. Le nombre total d'échantillons devant être préparés pour l'étude est calculé selon la méthode suivie.

L'étude préliminaire et l'étude principale reposent sur les mêmes méthodes, sauf indication contraire.

Les échantillons de sols séchés à l'air sont mélangés à un volume minimum de  $45 \text{ cm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M et agités pendant 12 h la nuit précédant l'expérience. On y ajoute par la suite de la solution de réserve de la substance d'essai afin d'obtenir un volume final de  $50 \text{ cm}^3$ . Ce volume ajouté ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse ( $50 \text{ cm}^3$ ) afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de pré-équilibre. Par ailleurs, la concentration initiale de la substance d'essai en contact avec le sol ( $C_0$ ) doit être supérieure d'au moins deux ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode analytique. Ce seuil permet d'obtenir des mesures fiables, même en cas d'adsorption élevée (> 90%) et de déterminer ultérieurement les isothermes d'adsorption. La concentration ( $C_0$ ) de la substance initiale ne devrait pas non plus excéder la moitié de sa limite de solubilité.

Voici comment calculer la concentration de la solution de réserve ( $C_{sr}$ ). Si la limite de détection est de  $0.01 \mu\text{g cm}^{-3}$  et l'adsorption de 90 %, la concentration initiale de la substance en contact avec le sol sera de préférence de  $1 \mu\text{g cm}^{-3}$  (soit de deux ordres de grandeur plus élevée que celle de la limite de détection). En supposant que l'on ajoute le volume maximum recommandé de la solution de réserve, soit  $5 \text{ cm}^3$ , aux  $45 \text{ cm}^3$  de la solution d'équilibre de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (c.-à-d. 10% de la solution de réserve au volume total de la phase aqueuse), la concentration de la solution de réserve sera de  $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ , ce qui est de trois ordres de grandeur supérieur à la limite de détection de la méthode analytique.

Il faut mesurer le pH de la phase aqueuse avant et après le contact avec le sol, compte tenu de son rôle dans le processus d'adsorption, notamment dans le cas des substances ionisables.

Le mélange est agité jusqu'à ce que le point d'équilibre soit atteint. Le temps d'équilibre dans les sols est très variable. Il dépend du produit chimique et du sol. Une période de 24 heures est généralement suffisante (77). Lors de l'étude préliminaire, des échantillons peuvent être prélevés de manière séquentielle pendant une période de mélange de 48 h (à la 4ème, 8ème, 24ème et 48ème heure, p. ex.). Les temps d'analyse ne sont pas rigides et doivent être considérés en fonction du programme de travail du laboratoire.

La substance dans la solution aqueuse peut être mesurée par la méthode parallèle ou par la méthode séquentielle. La méthode parallèle est plus difficile à réaliser sur le plan expérimental mais le traitement mathématique des résultats est plus simple (voir l'annexe 5). Le choix de la méthode est laissée à l'appréciation de l'expérimentateur qui décide en fonction des équipements de laboratoire et des ressources disponibles.

(a) méthode parallèle: on prépare des échantillons avec un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique d'adsorption. Après centrifugation et, le cas échéant, filtration, la phase aqueuse du premier tube est récupérée aussi complètement que possible et mesurée au bout de 4 h, par exemple, celle du deuxième tube au bout de 8 h, celle du troisième au bout de 24 h, etc.

(b) méthode séquentielle: on prépare uniquement un double échantillon pour chaque rapport sol/solution. Le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance, puis l'expérience se poursuit avec le mélange original. S'il y a filtration après centrifugation, le laboratoire doit disposer d'équipements permettant de filtrer de petites aliquotes en phase aqueuse. Le volume total des aliquotes ne devrait pas dépasser 1 % du volume total de la solution afin de ne pas modifier de manière significative le rapport sol/solution et de diminuer la masse de soluté susceptible d'être adsorbée durant l'essai.

Le pourcentage d'adsorption  $A_{t_i}$  est calculé à chaque instant ( $t_i$ ) sur la base de la concentration initiale nominale et de la concentration mesurée au temps d'échantillonnage ( $t_i$ ), corrigé de la valeur du témoin. Des graphes représentant  $A_{t_i}$  en fonction du temps (fig. 1, annexe 5) sont tracés afin de savoir à quel moment le plateau d'équilibre est atteint<sup>2</sup>. On calcule également la valeur  $K_d$  à l'équilibre. On choisit à partir de cette valeur le rapport sol/solution approprié de la figure 1, de manière que le pourcentage d'adsorption dépasse 20% et, de préférence, 50% (61). Les équations et les principes relatifs au tracé sont exposés dans le chapitre "Présentation des données", ainsi qu'à l'annexe 5.

#### 1.9.2.2 *Détermination du temps d'adsorption et de la quantité de substance adsorbée à l'équilibre*

Comme nous l'avons déjà dit, le graphe représentant  $A_{t_i}$  ou  $C_{aq}^{ads}$  en fonction du temps permet d'estimer l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre (voir les figures 1 et 2 de l'annexe 5). Le temps d'équilibre correspond au temps que le système met pour atteindre un plateau.

L'absence de plateau ou l'accroissement progressif de la courbe peut être dû à des facteurs complexes tels que la biodégradation ou une diffusion lente. La biodégradation peut être mise en évidence en répétant l'expérience avec un échantillon de sol stérile. Si aucun plateau n'est atteint même dans ce cas, l'expérimentateur doit chercher d'autres causes inhérentes à l'étude. Il peut par exemple modifier les conditions de l'essai (température, temps d'agitation, rapport sol/solution). Lui seul décide de poursuivre la procédure d'essai, même s'il court le risque de ne pas atteindre un équilibre.

#### 1.9.2.3 *Adsorption sur les parois du récipient et stabilité de la substance*

L'analyse des échantillons de contrôle peut fournir quelques informations sur l'adsorption de la substance sur les parois des récipients d'essai, ainsi que sur sa stabilité. Une déplétion supérieure à l'écart-type de la méthode analytique peut être due à une dégradation abiotique et/ou à l'adsorption sur les parois du récipient. On peut individualiser l'un ou l'autre de ces phénomènes en lavant soigneusement les parois du récipient avec un volume connu de solvant, puis en recherchant la substance dans la solution de lavage. L'absence d'adsorption sur les parois du récipient prouve l'instabilité abiotique de la substance. En cas d'adsorption, en revanche, il convient de modifier le matériau du récipient d'essai. Ces données sur l'adsorption sur les parois des récipients d'essai ne peuvent cependant pas être directement extrapolées à l'essai sol/solution, dans la mesure où la présence de sol modifie l'adsorption.

On peut obtenir des informations supplémentaires sur la stabilité de la substance d'essai en déterminant le bilan matière dans le temps. La substance est recherchée dans la phase aqueuse, dans les extraits de sol et sur les parois des récipients d'essai. La différence entre la masse de la substance ajoutée et la somme des masses de substance présentes dans la phase aqueuse, les extraits de sol et sur les parois des récipients correspond à la masse dégradée, volatilisée et/ou non extraite. Pour effectuer un bilan matière, l'équilibre d'adsorption doit être atteint durant l'essai.

---

<sup>2</sup> On peut également utiliser des graphiques de concentration de la substance en phase aqueuse ( $C_{aq}^{ads}$ ) en fonction du temps pour estimer l'obtention du plateau d'équilibre (voir la fig. 2 de l'annexe 5).

Le bilan matière est effectué sur les deux sols et avec un rapport sol/solution par sol générant une déplétion à l'équilibre supérieure à 20% et, de préférence, à 50 %. Une fois que l'essai consistant à trouver le rapport sol/solution est terminé (analyse du dernier échantillon de phase aqueuse au bout de 48h), les phases sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration. Le maximum de phase aqueuse est récupérée puis un solvant d'extraction approprié (c.-à-d. doté d'un coefficient d'extraction d'au moins 95 %) est ajouté au sol afin d'extraire la substance. Deux extractions successives au moins sont recommandées. On détermine ensuite la quantité de substance présente dans les extraits de sol et dans le récipient afin de calculer le bilan matière (équation 10 du chapitre "Présentation des données"). S'il est inférieur à 90%, la substance est jugée instable durant la durée de l'essai. Les études peuvent être cependant poursuivies en tenant compte de cette instabilité. Il est conseillé dans ce cas d'analyser les deux phases lors de l'étude principale.

#### 1.9.2.4 Phase 2 - Cinétique d'adsorption avec une concentration unique de substance

Cinq sols choisis dans le tableau 1 sont utilisés à cet effet. On a intérêt à y inclure tout ou partie des sols utilisés dans l'étude préliminaire. Dans ce cas, ils ne sont pas soumis aux essais de la phase 2.

Le temps d'équilibrage, le rapport sol/solution, le poids de l'échantillon de sol, le volume de la phase aqueuse en contact avec le sol et la concentration de la substance d'essai dans la solution sont choisis en fonction des résultats de l'étude préliminaire. L'analyse doit être effectuée de préférence après un temps de contact de 2, 4, 6, 8 (éventuellement 10) et 24 h. Le temps d'agitation peut être étendu à 48 h maximum lorsque les résultats sur le rapport sol/solution font ressortir un temps d'équilibrage plus long. Les temps d'analyse doivent être considérés avec une certaine souplesse.

Chaque expérience (un sol et une solution) est effectuée au moins en double afin d'évaluer la variance des résultats. Un témoin est préparé pour chacune d'elle avec du sol et de la solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sans substance d'essai, d'un poids et d'un volume identiques aux échantillons d'essai. Un échantillon de contrôle préparé uniquement à partir de la substance d'essai contenue dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans sol) est soumis à la même procédure d'essai afin de se prémunir contre l'imprévu.

Le pourcentage d'adsorption est calculé à chaque instant  $A_{t_1}$  et/ou intervalle de temps  $A_{\Delta t_1}$  (selon les besoins). Il est porté sur un graphe en fonction du temps. Le coefficient de distribution  $K_d$  à l'équilibre ainsi que le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique  $K_{oc}$  (pour les substances chimiques non polaires) sont également calculés.

#### Résultats de l'essai de cinétique d'adsorption

La valeur linéaire  $K_d$ , qui exprime la mobilité inhérente des substances chimiques dans le sol, est généralement suffisamment précise pour décrire le comportement de sorption du sol (35)(78). Les substances chimiques dont  $K_d$  est  $\leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  sont en général considérées comme étant mobiles. Mac Gall et coll. ont élaboré un système de classification de la mobilité fondé sur les valeurs  $K_{oc}$  (16). Il existe également des systèmes de classification de la lixiviation fondés sur la relation entre  $K_{oc}$  et DT-50<sup>3</sup> (32)(79).

Selon les études d'analyse d'erreurs (61), les valeurs  $K_d$  inférieures à  $0.3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  ne peuvent pas être estimées avec précision à partir d'une diminution de la concentration dans la phase aqueuse, même si l'on applique le rapport sol/solution le plus favorable (sur le plan de la précision), c'est-à-dire 1:1. Dans ce cas, l'analyse des deux phases (sol et solution) est recommandée.

---

<sup>3</sup> DT-50: temps de dégradation de 50% de la substance d'essai.

En ce qui concerne les remarques précédentes, il est conseillé de poursuivre l'étude du comportement de sorption d'un produit chimique dans le sol et de sa mobilité potentielle en déterminant les isothermes d'adsorption de Freundlich des systèmes dont on peut déterminer précisément  $K_d$  grâce au protocole expérimental suivi dans la présente méthode. Il suffit pour cela que la valeur obtenue en multipliant  $K_d$  avec le rapport sol/solution soit  $> 0.3$  - lorsque les mesures reposent sur la baisse de concentration de la phase aqueuse (méthode indirecte) -ou  $> 0.1$  lorsque les deux phases sont analysées (méthode directe) (61).

#### 1.9.2.5 Phase 3 - Isothermes d'adsorption, cinétique de désorption et isothermes de désorption

##### 1.9.2.5.1 Isothermes d'adsorption

On utilise cinq concentrations de substances d'essai couvrant de préférence deux ordres de grandeur. La solubilité dans l'eau et les concentrations à l'équilibre de la phase aqueuse qui en résultent sont prises en compte lors du choix de ces concentrations. Il convient de garder le même rapport sol/solution par sol tout au long de l'étude. L'essai d'adsorption est effectué selon la description ci-dessus, à la différence près que la phase aqueuse est analysée une seule fois, au moment où le point d'équilibre déterminé au cours de la phase 2 est atteint. Les concentrations à l'équilibre dans la solution sont déterminées et la quantité adsorbée est calculée à partir de la déplétion de la substance dans la solution ou avec la méthode directe. La masse adsorbée par unité de masse de sol est portée sur un graphe en fonction de la concentration à l'équilibre de la substance (voir le chapitre "Présentation des données").

##### Résultats de l'essai relatif aux isothermes d'adsorption

De tous les modèles mathématiques d'adsorption proposés jusqu'à présent, l'isotherme de Freundlich est le plus fréquemment utilisé pour décrire les processus d'adsorption. On peut trouver de plus amples informations sur l'interprétation et l'importance des modèles d'adsorption dans la bibliographie (41)(45)(80)(81)(82).

**Remarque:** il est bon de mentionner qu'une comparaison des valeurs  $K_F$  (coefficient d'adsorption de Freundlich) de différentes substances n'est possible que si ces valeurs sont exprimées en unités identiques (83).

##### 1.9.2.5.2 Cinétique de désorption

Cet essai vise à évaluer le caractère réversible ou irréversible de l'adsorption d'une substance sur un sol. C'est une information importante dans la mesure où le processus de désorption joue un rôle non négligeable dans le comportement d'une substance chimique dans un sol. Ces données sur la désorption peuvent également servir à élaborer des modèles informatisés de simulation du lessivage et de l'écoulement des substances dissoutes. Si l'on souhaite effectuer une étude de désorption, il est conseillé d'effectuer l'étude ci-après pour tous les systèmes dont on aura pu déterminer  $K_d$  au cours de l'essai sur la cinétique d'adsorption précédent.

Comme pour l'étude sur la cinétique d'adsorption, l'essai sur la cinétique de désorption peut se faire selon la méthode parallèle ou la méthode séquentielle. Le choix de la méthode est laissé à l'appréciation de l'expérimentateur, qui devra considérer les disponibilités en équipements de laboratoire et en ressources.



(a) méthode parallèle: on prépare, pour chaque sol inclus dans l'étude de désorption, des échantillons ayant un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique de désorption. Il est préférable d'utiliser les mêmes intervalles de temps que pour l'étude sur la cinétique d'adsorption. Le temps total peut cependant être étendu de manière que le système parvienne à l'équilibre de désorption. On prépare un témoin pour chaque expérience (un sol, une solution) à partir de sol et d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans substance d'essai), d'un poids et d'un volume identiques à ceux de l'expérience. La substance d'essai dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans sol) est soumise à la même procédure d'essai en tant qu'échantillon de contrôle. Tous les mélanges sol/solution sont agités jusqu'à l'équilibre d'adsorption (tel qu'il a été déterminé dans la phase 2). Les phases sont ensuite séparées par centrifugation et les phases aqueuses sont extraites le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ne contenant pas de substance d'essai et ces mélanges sont à nouveau agités. La phase aqueuse du premier tube est récupérée le plus complètement possible puis mesurée après 2 h, par exemple, celle du deuxième tube après 4 h, celle du troisième après 6 h, etc., jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint.

(b) méthode séquentielle: après l'essai de cinétique d'adsorption, le mélange est centrifugé et la phase aqueuse est extraite le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M sans substance d'essai. Ce mélange est agité jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint. Pendant ce temps, le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance d'essai, puis on poursuit l'expérience avec le mélange original. Le volume de chaque aliquote ne devrait pas dépasser 1% du volume total. La même quantité de solution fraîche de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M est ajoutée au mélange afin de maintenir le rapport sol/solution, puis celui-ci est agité jusqu'au prochain intervalle de temps.

Le pourcentage de désorption est calculé à chaque temps ( $D_{t_1}$ ) et/ou intervalle de temps ( $D_{\Delta t_1}$ ) (selon les besoins de l'étude), puis il est porté sur un graphique en fonction du temps. Le coefficient de désorption  $K_{des}$  à l'équilibre est également calculé. Toutes les équations applicables sont données dans le chapitre "Présentation des données" de l'annexe 5.

#### Résultats de l'essai de cinétique de désorption

L'inscription sur un même graphe du pourcentage de désorption  $D_{t_1}$  et d'adsorption  $A_{t_1}$  en fonction du temps permet d'estimer la réversibilité du processus d'adsorption. L'adsorption est jugée réversible si l'équilibre de désorption est atteint avant le double de temps nécessaire à l'équilibre d'adsorption et si la désorption totale est supérieure à 75% de la quantité adsorbée.

#### 1.9.2.5.3 Isothermes de désorption

Les isothermes de désorption de Freundlich sont déterminés sur les sols utilisés lors de l'expérience relative aux isothermes d'adsorption. L'essai de désorption est réalisé selon les modalités décrites dans le chapitre "Cinétique de désorption", à la différence près que la phase aqueuse n'est analysée qu'une fois, à l'équilibre de désorption. On calcule ensuite la quantité de substance désorbée. La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est portée sur un graphe en fonction de la concentration d'équilibre de la substance d'essai en solution (voir le chapitre "Présentation des données" et l'annexe 5).

## 2. PRESENTATION DES DONNEES

Les données analytiques sont présentées sous forme de tableaux (voir l'annexe 6) dans lesquels figurent les mesures et les moyennes calculées. Les isothermes d'adsorption sont représentés sous forme de graphiques. Les calculs sont effectués selon les modalités présentées ci-après.

Pour les besoins de l'essai, on estime que le poids de  $1 \text{ cm}^3$  de solution aqueuse est de 1g. Le rapport sol/solution peut être exprimé en M/M ou M/vol.

L'adsorption ( $A_{t_i}$ ) est définie comme le pourcentage de substance adsorbée sur le sol en fonction de la quantité présente au début de l'essai, dans les conditions de l'essai. Si la substance est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur la paroi du récipient,  $A_{t_i}$  est calculé à chaque instant  $t_i$  selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

où:

$A_{t_i}$  = est le pourcentage d'adsorption à l'instant  $t_i$  (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = est la masse de substance d'essai adsorbée sur le sol durant le temps  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = est la masse de substance dans le tube au début de l'essai ( $\mu\text{g}$ ).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur le mode de calcul du pourcentage d'adsorption  $A_{t_i}$  avec les méthodes parallèles et séquentielles.

Le coefficient de répartition  $K_d$  est le rapport entre le contenu de la substance dans le sol et sa concentration massique dans la solution aqueuse, dans les conditions d'essai, lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint.

Soit:

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

où:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ). Elle est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins.

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{soil}}$  = est la quantité de phase de sol exprimée en masse sèche de sol (g);

$V_0$  = est le volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol ( $\text{cm}^3$ ).

La relation entre  $A_{\text{eq}}$  et  $K_d$  est donnée par l'équation suivante:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

où:

$A_{eq}$  = est le pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

Le coefficient normalisé basé sur la teneur en carbone organique  $K_{oc}$  lie le coefficient de répartition  $K_d$  à la teneur en carbone organique de l'échantillon de sol:

soit:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

où:

$\%OC$  = est le pourcentage de carbone organique dans l'échantillon de sol ( $\text{g g}^{-1}$ ).

Le coefficient  $K_{oc}$  représente une valeur unique qui caractérise principalement le partage de substances chimiques non polaires entre le carbone organique dans le sol ou sédiment et eau. L'adsorption de ces substances est liée à la teneur organique du solide adsorbant (7); les valeurs  $K_{oc}$  dépendent donc des caractéristiques spécifiques des fractions humiques dont la capacité de sorption varie considérablement selon l'origine, la genèse, etc.

### 2.1.1 Isothermes d'adsorption

L'équation des isothermes d'adsorption de Freundlich lie la quantité de substance adsorbée à la concentration de substance en solution à l'équilibre (équation 8).

Les données sont traitées comme dans le chapitre "Adsorption". On calcule pour chaque tube d'essai la quantité de la substance adsorbée sur le sol après l'essai d'adsorption ( $C_s^{ads}(eq)$ ), noté ailleurs x/m).

On suppose que l'équilibre a été atteint et que  $C_s^{ads}(eq)$  représente la valeur d'équilibre:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

L'adsorption de Freundlich est donnée par l'équation suivante (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

ou, sous sa forme linéaire, par:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

où:

$K_F^{ads}$  = est le coefficient d'adsorption de Freundlich; il se mesure en  $cm^3 g^{-1}$  uniquement si  $1/n = 1$ ; dans tous les autres cas, la pente  $1/n$  s'écrit  $K_F^{ads} (\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1})$ ;

$n$  = est la constante de régression;  $1/n$  est généralement compris entre 0.7 et 1.0, ce qui indique que la donnée de sorption est fréquemment légèrement non linéaire.

Les équations (8) et (9) sont portées sur un graphique et les valeurs  $K_F^{ads}$  et  $1/n$  sont calculées au moyen d'une analyse de régression utilisant l'équation 9. Le coefficient de corrélation  $r^2$  de l'équation logarithmique est également calculé. La figure 2 donne des exemples de graphes.

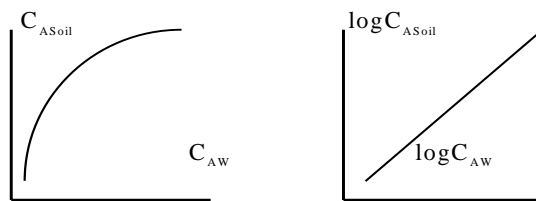


Fig. 2. Graphique d'adsorption de Freundlich, normalisé et linéarisé

### 2.1.2

#### Bilan matière

Le bilan matière (MB) correspond au pourcentage de substance récupéré par analyse après un essai d'adsorption par rapport à la quantité nominale de substance présente au début de l'essai.

Le traitement des données est différent si le solvant est complètement miscible avec l'eau. On peut dans ce cas appliquer le traitement des données visé au chapitre "Désorption" pour déterminer la quantité de substance extraite par solvant. Si celui-ci est moins miscible avec l'eau, il convient de déterminer la quantité récupérée.

Le bilan matière de l'adsorption est calculé de la manière suivante: on suppose que le terme ( $m_E$ ) correspond à la somme des masses de substance extraites du sol et de la surface du récipient d'essai au moyen d'un solvant organique.

soit:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

où:

MB = est le bilan matière (%);

$m_E$  = est la masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du récipient ( $\mu g$ );

$C_0$  = est la concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol ( $\mu g cm^{-3}$ );

$V_{rec}$  = est le volume de surnageant récupéré à l'équilibre d'adsorption ( $cm^3$ ).

## 2.2 DESORPTION

La désorption (D) est définie comme le pourcentage de substance désorbée, rapporté à la quantité de substance préalablement adsorbée, dans les conditions d'essai:

soit:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

où:

$D_{t_i}$  = est le pourcentage de désorption à l'instant  $t_i$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = est la masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant  $t_i$ , ( $\mu\text{g}$ );

$m_s^{ads}(eq)$  = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption, ( $\mu\text{g}$ ).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur la manière de calculer le pourcentage de désorption  $D_{t_i}$  par la méthode parallèle et séquentielle.

Le coefficient de désorption apparente ( $K_{des}$ ) correspond, dans les conditions d'essai, au rapport entre le contenu de la substance restant dans la phase du sol et la concentration massique de la substance désorbée dans la solution aqueuse, lorsque l'équilibre de désorption est atteint:

soit:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

où:

$K_{des}$  = est le coefficient de désorption ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ );

$m_{aq}^{des}(eq)$  = est la masse totale de substance désorbée à partir du sol à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = est le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption ( $\text{cm}^3$ ).

Le chapitre "Désorption" de l'annexe 5 explique comment calculer  $m_{aq}^{des}(eq)$ .

### Remarque

Si l'essai d'adsorption a été réalisé avec la méthode parallèle, le volume  $V_T$  de l'équation (12) est estimé égal à  $V_0$ .

### 2.2.1 Isothermes de désorption

L'équation des isothermes de désorption de Freundlich relie la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à la concentration de substance en solution à l'équilibre de désorption (équation 16).

La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est calculé pour chaque tube de la manière suivante:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$  est défini comme :

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad (\mu\text{g}) \quad (14)$$

où:

$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{A}}$  = est la masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un remplacement volumique incomplet ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la masse de substance en solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left( \frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_{\text{F}}^{\text{F}}$  = est le volume de solution prélevé du tube afin de mesurer la substance, à l'équilibre de désorption ( $\text{cm}^3$ );

$V_{\text{R}}$  = est le volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par le même volume de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ );

L'équation de la désorption de Freundlich s'écrit (16):

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

ou, sous une forme linéaire:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

où:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$  = est le coefficient de désorption de Freundlich;

$n$  = est la constante de régression;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la concentration massique de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ).

Les équations (16) et (17) peuvent être portées sur un graphique et les valeurs  $K_F^{des}$  et  $1/n$  sont calculées au moyen d'une analyse de régression en utilisant l'équation 17.

Remarque:

Si l'exposant d'adsorption ou de désorption de Freundlich  $1/n$  est égal à 1, les constantes d'adsorption ou de désorption de Freundlich ( $K_F^{ads}$  et  $K_F^{des}$ ) sont identiques aux constantes d'adsorption ou de désorption à l'équilibre ( $K_d$  et  $K_{des}$ ) et les graphiques de  $C_s$  en fonction de  $C_{aq}$  seront linéaires. Si les exposants ne sont pas égaux à 1, les graphiques de  $C_s$  en fonction de  $C_{aq}$  seront non linéaires et les constantes d'adsorption et de désorption varieront selon les isothermes.

## 2.2.2

### PROCES-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal doit comprendre les informations suivantes:

- Identification complète des échantillons de sol utilisés, à savoir:
  - références géographiques du site (latitude, longitude);
  - date de l'échantillonnage;
  - origine (sol agricole, forêt, etc.);
  - profondeur de l'échantillonnage;
  - contenu en sable/limon/argile;
  - valeurs du pH (dans  $CaCl_2$  0,01M);
  - teneur en carbone organique;
  - teneur en matière organique;
  - teneur en azote;
  - rapport C/N;
  - capacité d'échange cationique (mmol/kg);
  - toutes les informations sur la collecte et le stockage des échantillons de sol;
  - le cas échéant, toutes les informations utiles à l'interprétation de l'adsorption et de la désorption de la substance testée;
  - la référence aux méthodes utilisées pour déterminer chaque paramètre;
- le cas échéant, des informations sur la substance à tester;
- la température des essais;
- les conditions de centrifugation;
- le procédé utilisé pour analyser la substance;
- les raisons motivant l'emploi d'un agent solubilisant pour préparer la solution de substance de réserve;
- les raisons expliquant les corrections de calcul, le cas échéant;
- les données relatives au formulaire (annexe 6) et à la présentation graphique;
- toutes les informations et observations utiles pour interpréter les résultats des essais.

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzele O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ( $K_{oc}$ ) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

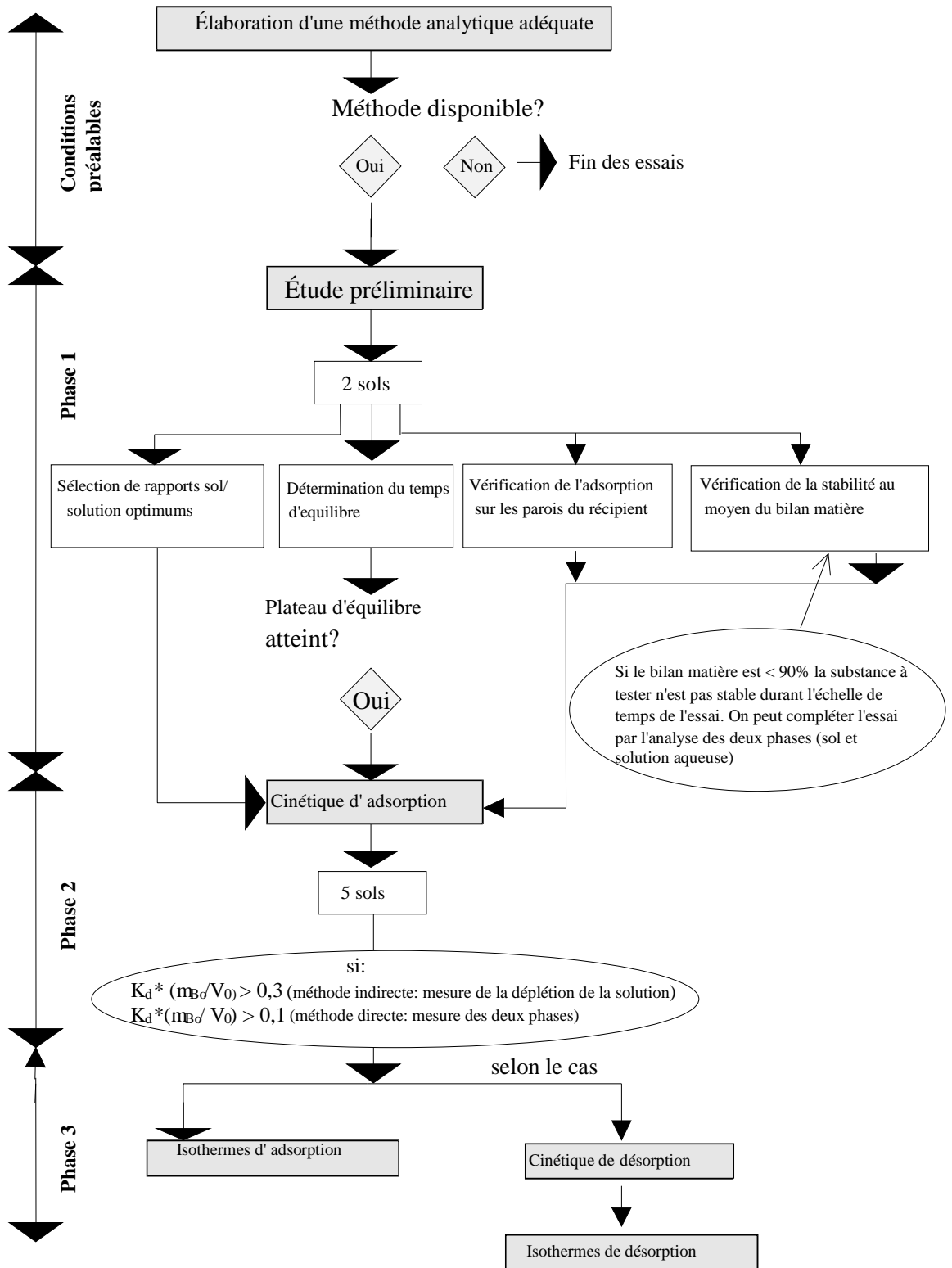


21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorpton estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", *CREAMS*, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. " Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), " Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D. (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

**ANNEXE 1**  
**Organigramme d'essai**



ANNEXE 2

**LES EFFETS DE LA PRECISION DE LA METHODE ANALYTIQUE ET DES VARIATIONS DE CONCENTRATION SUR LA PRECISION DES RESULTATS DE L'ADSORPTION**

Il ressort clairement du tableau suivant (84) que si la différence entre la masse initiale ( $m_0=110 \mu\text{g}$ ) et la masse ( $m_s^{\text{ads}}(\text{eq})=100\mu\text{g}$ ) de la substance dans la solution à l'équilibre est très faible, une erreur de 5% dans la mesure de la concentration à l'équilibre fausse de 50% le calcul de la quantité de la substance adsorbée sur le sol ( $m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ ) et de 52.4% le calcul de  $K_d$ .

Quantité de sol  $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$   
 Volume de solution  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$	$R_{\dagger}$	$K_d^*$	$R_{\dagger}$
	( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )		( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	<b>POUR A = 9%</b>							
	100	1.000	valeur réelle	10	1.00	valeur réelle	1	
	101	1.010	1%	9	0.90	10%	0.891	10.9%
	105	1.050	5%	5	0.50	50%	0.476	52.4%
	109	1.090	9%	1	0.10	90%	0.092	90.8%
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	<b>POUR A = 55%</b>							
	50.0	0.500	true valfue	60.0	6.00	valeur réelle	12.00	
	50.5	0.505	1%	59.5	5.95	0.8%	11.78	1.8%
	52.5	0.525	5%	57.5	5.75	4.0%	10.95	8.8%
	55.0	0.550	10%	55.0	5.50	8.3%	10.00	16.7%
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	<b>POUR A = 99%</b>							
	1.100	0.011	valeur réelle	108.9	10.89	valeur réelle	990	
	1.111	0.01111	1%	108.889	10.8889	0.01%	980	1.0%
	1.155	0.01155	5%	108.845	10.8845	0.05%	942	4.8%
	1.21	0.0121	10%	108.790	10.8790	0.10%	899	9.2%

$$* \quad m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  est la masse de substance dans la phase de sol à l'équilibre ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  est la masse de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre ( $\mu\text{g}$ );

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  est la concentration de substance dans la phase de sol à l'équilibre ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre;  $\mu\text{g cm}^{-3}$ ;

R est l'erreur analytique lors du calcul de  $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  ;

$R^{\ddagger}$  est l'erreur calculée due à l'erreur analytique R.

### ANNEXE 3

#### TECHNIQUES D'ESTIMATION DE $K_d$

1. Les techniques d'estimation permettent de prédire  $K_d$  en se fondant sur des corrélations avec des valeurs  $P_{ow}$ , (12)(39)(63-68), avec des données sur l'hydrosolubilité (12)(19)(21)(39)(68-73) ou avec des données sur la polarité obtenues par HPLC en phase inversée (74-76). Comme le montrent les tableaux 1 et 2, on calcule  $K_{oc}$  ou  $K_{om}$  à partir de ces équations puis on obtient, indirectement,  $K_d$  à partir des équations suivantes:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Ces corrélations se fondent sur deux hypothèses: 1) c'est la matière organique du sol qui influence principalement l'adsorption d'une substance; 2) les interactions en jeu sont essentiellement non polaires. Il en résulte que ces corrélations: 1) ne sont pas applicables aux substances polaires, ou uniquement de manière limitée et: 2) qu'elles ne s'appliquent pas lorsque la teneur en matière organique du sol est très faible (12). Par ailleurs, si l'on a trouvé des corrélations satisfaisantes entre  $P_{ow}$  et l'adsorption (19), on ne peut pas en dire autant des relations entre l'hydrosolubilité et l'étendue de l'adsorption (19)(21); les études sont par conséquent très contradictoires.

3. Les tableaux 1 et 2 donnent quelques exemples de corrélations entre le coefficient d'adsorption et, respectivement, le coefficient de partage octanol-eau et l'hydrosolubilité.

**Tableau 1.** Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et le coefficient de partage octanol-eau; pour d'autres exemples voir (12) (68).

Substances	Corrélations	Auteurs
Urée substituée	$\log K_{om} = 0.69 + 0.52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Substances aromatiques chlorées	$\log K_{oc} = -0.779 + 0.904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Divers pesticides	$\log K_{om} = 4.4 + 0.72 \log P_{ow}$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Hydrocarbures aromatiques	$\log K_{oc} = -2.53 + 1.15 \log P_{ow}$	Vowles et Mantoura (1987) (67)

**Tableau 2.** Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et l'hydrosolubilité; pour d'autres exemples voir (68) (69).

Composés	Corrélations	Auteurs
Divers pesticides	$\log K_{om} = 3.8 - 0.561 \log S_w$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Substances aliphatiques aromatiques chlorées	$\log K_{om} = (4.040 \pm 0.038) - (0.557 \pm 0.012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
$\alpha$ -naphthol	$\log K_{oc} = 4.273 - 0.686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Substances cycliques aliphatiques chlorées	$\log K_{oc} = -1.405 - 0.921 \log S_w - 0.00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Divers composés	$\log K_{om} = 2.75 - 0.45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

## ANNEXE 4

### CALCUL DES CONDITIONS DE CENTRIFUGATION

1. Le temps de centrifugation est donné par la formule suivante (on suppose que les particules sont sphériques):

$$t = \frac{9}{2} \left[ \frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Par commodité, tous les paramètres sont indiqués en unités n'appartenant pas au SI (g, cm).

$\omega$	=	vitesse de rotation (=2 $\pi$ rpm/60), rad s <sup>-1</sup> ;
rpm	=	tours par minute;
$\eta$	=	viscosité de la solution, g s <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ;
$r_p$	=	rayon des particules, cm;
$\rho_s$	=	densité du sol, g cm <sup>-3</sup> ;
$\rho_{aq}$	=	densité de la solution, g cm <sup>-3</sup> ;
$R_t$	=	distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et le haut de la solution dans le tube de la centrifugeuse, cm;
$R_b$	=	distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et la base du tube de la centrifugeuse, cm;
$R_b-R_t$	=	longueur du mélange sol/solution dans le tube de la centrifugeuse, cm.

Dans la pratique, le double du temps calculé est nécessaire pour obtenir une séparation complète.

2. On peut simplifier l'équation (1) si l'on considère que la viscosité ( $\eta$ ) et la densité ( $\rho_{aq}$ ) de la solution sont égales à la viscosité et à la densité de l'eau à 25 °C; dans ce cas,  $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et  $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ .

Le temps de centrifugation est donné par l'équation (2):

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \dots\dots\dots(2)$$

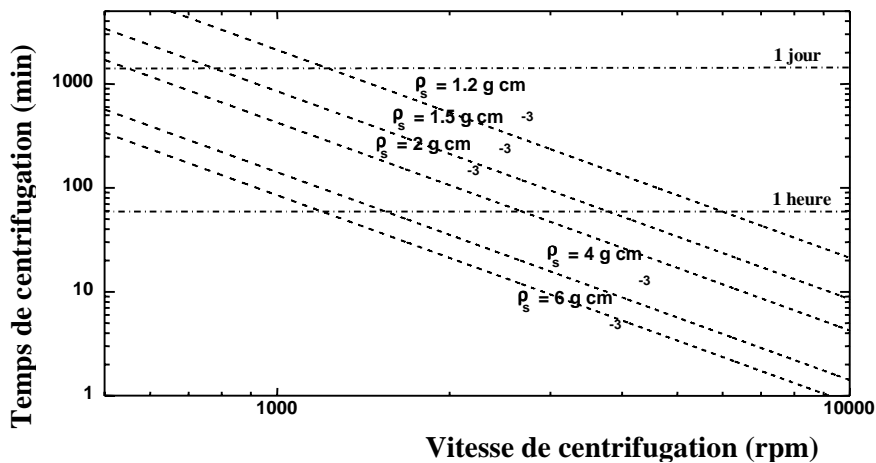
3. L'équation (2) montre l'importance des paramètres du temps (t) et de la vitesse (rpm) pour définir les conditions de centrifugation permettant de séparer des particules d'une taille définie (c.-à-d. d'un rayon de 0.1  $\mu\text{m}$  dans notre cas): 1) la densité du sol et 2) la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse ( $R_b-R_t$ ) déterminent la distance qu'une particule de sol doit parcourir entre le haut de la solution et la base du tube; il apparaît que, pour un volume fixe, la longueur du mélange dans le tube dépend du carré du rayon du tube.

4. La figure 1 présente les différents temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) pour différentes densités du sol ( $\rho_s$ ) (fig.1a) et pour différentes longueurs du mélange dans les tubes de la centrifugeuse (fig.2a). La fig.1a montre nettement l'influence de la densité du sol. Pour une centrifugation classique de 3000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 240 min pour une densité du sol de 1.2 g cm<sup>3</sup>, alors qu'il n'est que de 50 min pour 2.0 g cm<sup>3</sup>. La fig 1b montre d'une manière similaire que, pour une centrifugation classique de 3000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 50 min pour un mélange de 10 cm de long et de seulement 7 min pour une longueur de 1 cm. Il convient cependant de trouver un compromis optimal entre un mode de centrifugation exigeant le moins de longueur possible et la séparation commode des phases après la centrifugation.

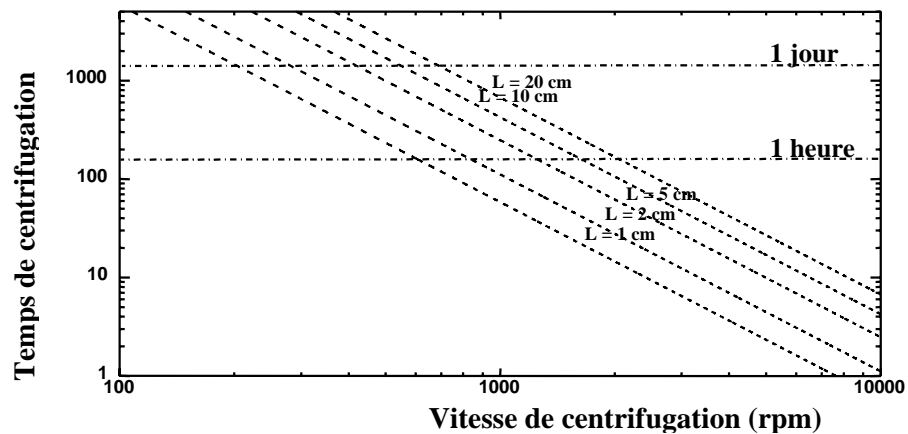


5. De plus, lorsque l'on définit les conditions expérimentales de la séparation sol/solution, il importe de considérer l'existence d'une troisième "pseudo-phase", les colloïdes. Ces particules, d'une taille inférieure à  $0.2 \mu\text{m}$ , peuvent influencer de manière significative le mécanisme d'adsorption d'une substance dans une suspension de sol. Après la centrifugation, réalisée comme cela est décrit ci-dessus, les colloïdes restent dans la phase aqueuse et sont analysés en même temps que celle-ci. On perd donc les informations sur leur impact.

Si le laboratoire dispose d'équipements d'ultracentrifugation ou d'ultrafiltration, il peut étudier plus en détail l'adsorption/désorption d'une substance dans le sol et obtenir des informations sur l'adsorption de la substance sur les colloïdes. Il faut effectuer dans ce cas une ultracentrifugation à  $60,000 \text{ rpm/min}$  ou une ultrafiltration avec des filtres d'une porosité de  $100,000$  dalton pour séparer les trois phases, sol, colloïdes, solution. Le protocole d'essai doit être modifié en conséquence, afin que les trois phases soient analysées.



**Fig. 1a.** Variation du temps de centrifugation ( $t$ ) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la densité du sol.  
 $(\rho_s)$ .  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et  $\rho_{\text{aq}} = 1.0 \text{ g.cm}^{-3}$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

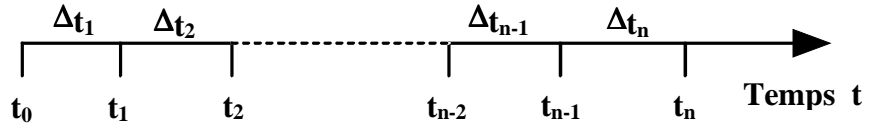


**Fig. 1b.** Variation du temps de centrifugation ( $t$ ) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse ( $R_b - R_t = L$ ;  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\rho_{\text{aq}} = 1.0 \text{ g.cm}^{-3}$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $\rho_s = 2.0 \text{ g cm}^{-3}$ .

## ANNEXE 5

### CALCUL DE L'ADSORPTION A (%) ET DE LA DESORPTION D (%)

Organisation de l'essai dans le temps:



On suppose pour tous les calculs que la substance d'essai est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur les parois du récipient.

#### ADSORPTION A (A%)

##### a) Méthode parallèle

Le pourcentage d'adsorption est calculé pour chaque tube d'essai (i) au temps ( $t_i$ ) selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

On peut calculer ainsi les termes de l'équation:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

où

$A_{t_i}$  = pourcentage d'adsorption (%) au temps  $t_i$ ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = masse de substance d'essai sur le sol au moment  $t_i$  où l'analyse est effectuée ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = masse de la substance d'essai dans le tube au début de l'essai ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  = concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps  $t_i$  où l'analyse est effectuée ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ); cette concentration est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins.

$V_0$  = volume initial de la solution en contact avec le sol ( $\text{cm}^3$ ).

Les valeurs du pourcentage d'adsorption  $A_{t_i}$  ou  $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  sont portées sur un graphe en fonction du temps', puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption (voir les fig. 1 et 2).

<sup>4</sup> Équation applicable à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

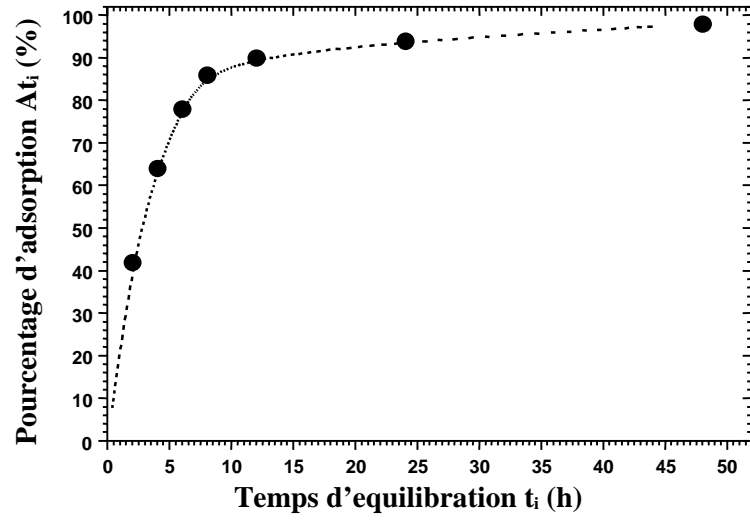


Fig. 1. Courbe de l'équilibre d'adsorption

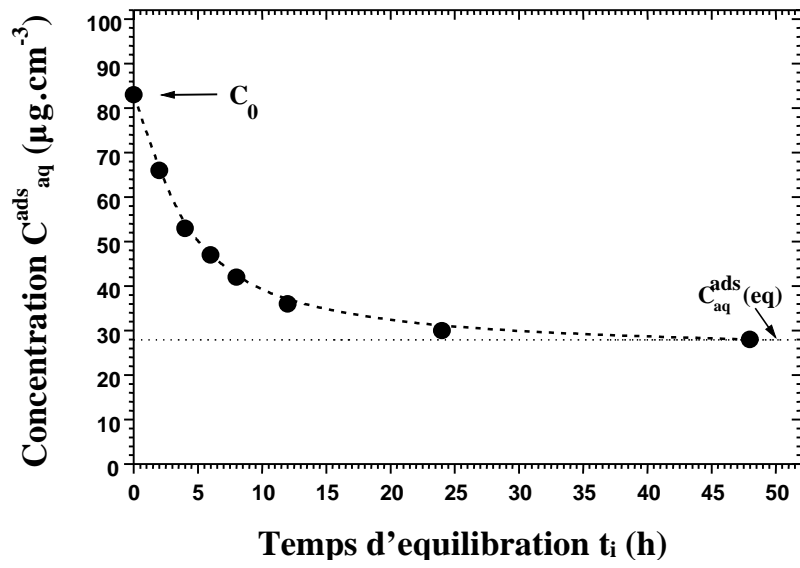


Fig.2. Concentration massique de la substance d'essai dans la phase aqueuse ( $C_{aq}$ ) en fonction du temps

## b) Méthode séquentielle

Les équations suivantes tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption s'opère en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes de la phase aqueuse à des intervalles de temps précis.

- Durant chaque intervalle de temps, la quantité de substance adsorbée sur le sol est calculée comme suit:

- pour le premier intervalle de temps  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

- pour le deuxième intervalle de temps  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

- pour le troisième intervalle de temps  $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

- pour le n<sup>ième</sup> intervalle de temps  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- Le pourcentage d'adsorption à chaque intervalle de temps  $A_{\Delta t_i}$  est calculé selon l'équation suivante:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

tandis que le pourcentage d'adsorption ( $A_{t_i}$ ) au temps  $t_i$  est donné par l'équation:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

---

<sup>5</sup> Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

Les valeurs de l'adsorption  $A_{t_i}$  ou  $A_{\Delta t_i}$  (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption.

- Au temps d'équilibre  $t_{eq}$ :

- la masse de substance adsorbée sur le sol est égale à:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- la masse de substance dans la solution est égale à:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- et le pourcentage d'adsorption à l'équilibre est égal à:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$  = masse de substance adsorbée sur le sol durant les intervalles de temps  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$  = masse de substance mesurée dans une aliquote  $v_a^A$  au temps  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_s^{ads}(eq)$  = masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$v_a^A$  = volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée ( $\text{cm}^3$ );

$A_{\Delta t_i}$  = pourcentage d'adsorption correspondant à l'intervalle de temps  $\Delta t_i$  (%);

$A_{eq}$  = pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

#### **DESORPTION D (%)**

Le temps  $t_0$  qui marque le début de l'essai de cinétique de désorption correspond au moment où le volume maximal de substance récupérée (une fois que l'équilibre d'adsorption a été atteint) est remplacé par un volume égal de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M.

### a) Méthode parallèle

Au temps  $t_i$ , on mesure la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse prélevée dans le tube  $i$  ( $V_i^1$ ) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{V_i^1} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

A l'équilibre de désorption  $t_i = t_{eq}$  de sorte que  $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ .

La masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps ( $\Delta t_i$ ) est donnée par l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Le pourcentage de désorption est calculé comme suit:

- au temps  $t_i$  avec l'équation:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- durant l'intervalle de temps ( $\Delta t_i$ ) avec l'équation:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

où:

$D_{t_i}$  = pourcentage de désorption au temps  $t_i$  (%);

$D_{\Delta t_i}$  = pourcentage de désorption à l'intervalle de temps  $\Delta t_i$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = masse de substance désorbée au temps  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$  = masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps  $\Delta t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_m^{des}(t_i)$  = masse de substance mesurée par analyse au temps  $t_i$  dans un volume de solution  $V_i^1$  prélevé pour l'analyse ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^A$  = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g$ );

$V_R$  = volume de surnageant prélevé du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égal de solution de  $CaCl_2$  0,01 M ( $cm^3$ );

$V_T^i$  = volume de solution prélevé du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption ( $cm^3$ ).

Les valeurs de désorption  $D_{t_i}$  ou  $D_{\Delta t_i}$  (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on calcule le temps mis pour atteindre l'équilibre de désorption

### b) Méthode séquentielle

Les équations ci-après tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption a été réalisé en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes ( $v_a^A$ ) de la phase aqueuse (voir le chapitre sur la méthode séquentielle dans le chapitre 1.9 "Réalisation de l'essai"). On suppose a) que le volume de surnageant prélevé du tube après l'essai de cinétique d'adsorption a été remplacé par un volume égal de solution de  $CaCl_2$  0,01 M ( $V_R$ ) et b) que le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol ( $V_T$ ) durant l'essai de cinétique de désorption reste constant et égal à l'équation suivante:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

Au temps  $t_i$ :

- La masse de substance est mesurée dans une petite aliquote ( $v_a^D$ ) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- A l'équilibre de désorption  $t_i = t_{eq}$  de sorte que  $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ .

- Le pourcentage de désorption  $D_{t_i}$  est calculé selon l'équation suivante:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

A l'intervalle de temps ( $\Delta t_i$ ):

- La quantité de substance désorbée durant chaque intervalle de temps est calculée de la manière suivante:

— pour le premier intervalle de temps  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left( \frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{et} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pour le deuxième intervalle de temps  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left( \frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left( \frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left( \frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad \text{et}$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[ m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

pour le  $n^{\text{ème}}$  intervalle de temps  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[ m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left( \frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left( \frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left( \frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$\text{et } m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Enfin, le pourcentage de désorption à chaque intervalle de temps  $D_{\Delta t_i}$  est calculé au moyen de l'équation suivante:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

tandis que le pourcentage de désorption  $D_{t_i}$  à un moment  $t_i$  est donné par l'équation ci-dessous:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masse de substance restant adsorbée sur le sol après les intervalles de temps  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masse de substance désorbée durant les intervalles de temps  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ );



$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$  = masse de substance mesurée dans une aliquote ( $v_a^D$ ) au temps  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle ( $\text{cm}^3$ );

$m_{\text{aq}}^A$  = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{\text{aq}}^A = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

$V_R$  = volume de surnageant extrait du tube après l'obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égale de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ );

$v_a^D$  = volume d'aliquote extrait du tube (i) pour analyse durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle ( $\text{cm}^3$ );

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

## ANNEXE 6

### ADSORPTION-DESORPTION DANS LES SOLS: PRESENTATION DES DONNEES (formulaire)

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h):..... ; ;.....%

Température:.....°C

#### Adéquation de la méthode analytique

Poids du sol	g	
Sol: matière sèche	g	
Volume de la solution de CaCl <sub>2</sub>	cm <sup>3</sup>	
Concentr. nominale de la solution finale	µg cm <sup>-3</sup>	
Concentr. d'analyse de la solution finale	µg cm <sup>-3</sup>	

Méthode analytique utilisée:

Calibration de la méthode analytique:



Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h):.....%

Température:.....°C

**Essai d'adsorption: témoins et contrôles**

	<b>Symbole</b>	<b>Unités</b>	<b>Témoin</b>		<b>Témoin</b>		<b>Contrôle</b>	
Tube n°								
Poids du sol	-	g					0	0
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)		cm <sup>3</sup>					-	-
Volume de solution de CaCl <sub>2</sub> 0.01 M ajouté		cm <sup>3</sup>						
Volume ajouté de solution de réserve de la substance		cm <sup>3</sup>	0	0				
Volume total de la phase aqueuse (calculé)		cm <sup>3</sup>					-	-
Concentr. initiale de la substance dans la phase aqueuse		µg cm <sup>-3</sup>						
<b>Après agitation et centrifugation</b>								
Concentration dans la phase aqueuse		µg cm <sup>-3</sup>						

Remarque: ajouter des colonnes si nécessaire

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C 12 h):.....%

Température:.....°C

### Bilan matière

	Symbole	Unités				
Tube n°						
Poids du sol	-	g				
Sol: matière sèche	$m_{\text{Sol}}$	g				
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	$V_{\text{WS}}$	ml				
Volume de $\text{CaCl}_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		ml				
Volume de solution de réserve		$\text{cm}^3$				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	$V_0$	$\text{cm}^3$				
Concentration initiale de la solution à tester	$C_0$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Temps d'équilibrage	-	h				
<b>Après agitation et centrifugation</b>						
Concentr. de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption, correction témoins incluse	$C_{\text{aq}}(\text{eq})$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Temps d'équilibrage	$t_{\text{eq}}$	h				
<b>1<sup>ère</sup> dilution au solvant</b>						
Volume extrait de phase aqueuse	$V_{\text{rec}}$	$\text{cm}^3$				
Volume ajouté de solvant	$\Delta V$	$\text{cm}^3$				
<b>1<sup>ère</sup> extraction au solvant</b>						
Signal analysé dans le solvant	$S_{\text{E1}}$	var.				
Concentr. de subst. dans le solvant	$C_{\text{E1}}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient	$m_{\text{E1}}$	$\mu\text{g}$				
<b>2<sup>ème</sup> dilution au solvant</b>						
Volume de solvant extrait	$\Delta V_s$	$\text{cm}^3$				
Volume de solvant ajouté	$\Delta V'$	$\text{cm}^3$				
<b>2<sup>ème</sup> extraction au solvant</b>						
Signal analysé dans le solvant	$S_{\text{E2}}$	var.				
Concentr. de subst. dans le solvant	$C_{\text{E2}}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient	$m_{\text{E2}}$	$\mu\text{g}$				
Masse totale de subst.; extraction en 2 étapes	$m_{\text{E}}$					
Bilan matière	MB	%				

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h):.....%

Température:.....°C

### Isothermes d'adsorption

	Symbole	Unités								
Tube n°										
Poids du sol	-	g								
Sol: matière sèche	E	g								
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	$V_{WS}$	$cm^3$								
Volume de $CaCl_2$ 0.01 M pour équilibrer le sol		$cm^3$								
Volume de solution de réserve ajouté		$cm^3$								
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol (calculé)	$V_0$	$cm^3$								
Concentration de la solution	$C_0$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temps d'équilibrage	-	h								
<b>Après agitation et centrifugation</b>										
Concentr. de la subst. dans la ph. aq., correction témoins incluse	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Température		°C								
Masse adsorbée par unité de sol	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Analyse de régression:

valeur de  $K_F^{ads}$  :

valeur de  $1/n$ :

coefficient de régression  $r^2$ :

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h):.....%

Température:.....°C

Méthode analytique utilisée:

Indirecte

Parallèle

Séquent.

### Essai de désorption

	Symbole	Unités	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps
Tube n° provenant de l'essai d'adsorption						
Masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume extrait de ph. aqueuse remplacé par CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	$V_R$	cm <sup>3</sup>				
Volume total de ph. aqueuse en contact avec le sol	PM	$V_0$	cm <sup>3</sup>			
	SM	$V_T$	cm <sup>3</sup>			
Masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant	$m_{aq}^A$	µg				
<b>Cinétique de désorption</b>						
Masse mesurée de substance désorbée du sol au temps $t_i$	$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Vol. de sol. extrait du tube (i) afin de mesurer la substance	PM	$v_i^j$	cm <sup>3</sup>			
	SM	$v_a^D$	cm <sup>3</sup>			
Masse de substance désorbée du sol du sol au temps $t_i$ (calculé)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masse de substance désorbée du sol durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$ (calculé)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				
<b>Pourcentage de désorption</b>						
Désorption au temps $t_i$	$D_{t_i}$	%				
Désorption à l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coefficient de désorption apparente	$K_{des}$					

PM: Méthode parallèle

SM: Méthode séquentielle

## C.19. ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION ( $K_{oc}$ ) SUR LE SOL ET LES BOUES D'EPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

### 1. METHODE

La méthode décrite reprend la ligne directrice n° 121 de l'OCDE (2000).

#### 1.1 INTRODUCTION

On peut décrire le comportement de sorption des substances dans les sols ou les boues d'épuration à l'aide de paramètres déterminés expérimentalement selon la méthode d'essai C18. Un des paramètres essentiels est le coefficient d'adsorption, défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans le sol ou les boues et sa concentration dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption. Le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique du sol ( $K_{oc}$ ) est un bon indicateur de la capacité de liaison d'une substance chimique à la matière organique du sol ou des boues d'épuration, et permet de comparer les substances chimiques entre elles. On peut estimer ce paramètre à partir de corrélations entre la solubilité dans l'eau et le coefficient de partage n-octanol/eau (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

La méthode expérimentale décrite dans cet essai utilise la HPLC pour estimer le coefficient d'adsorption  $K_{oc}$  dans le sol ou les boues d'épuration (8). Elle donne des résultats beaucoup plus fiables que ceux obtenus par les calculs de la méthode QSAR (9). En tant que méthode d'estimation, elle ne peut pas être totalement substituée aux essais par agitation conduits dans le cadre de la méthode d'essai C18. Toutefois, le  $K_{oc}$  estimé peut servir à sélectionner des paramètres d'essai pertinents pour l'étude des processus d'adsorption/désorption suivant la méthode précitée, grâce au calcul du coefficient de distribution ( $K_d$ ) ou du coefficient d'adsorption de Freundlich ( $K_f$ ) selon l'équation 3 (voir paragraphe 1.2).

#### 1.2 DEFINITIONS

$K_d$  est le coefficient de distribution défini comme le rapport des concentrations à l'équilibre (C) d'une substance d'essai dissoute dans un système à deux phases dont une sorbante (sol ou boues d'épuration) et l'autre aqueuse. Il est sans unité lorsque les concentrations dans les deux phases sont exprimées en termes de poids par poids. Si la concentration dans la phase aqueuse est exprimée en poids par volume, les unités sont alors en  $ml \cdot g^{-1}$ .  $K_d$  est susceptible de varier en fonction des propriétés du sorbant et peut dépendre de la concentration. On le calcule selon l'équation suivante:

$$K_d = \frac{C_{sol}}{C_{aq}} \text{ ou } \frac{C_{boues}}{C_{aq}} \quad (1)$$

où:

$C_{sol}$  est la concentration de la substance d'essai dans le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot g^{-1}$ );  
 $C_{boues}$  est la concentration de la substance d'essai dans les boues à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot g^{-1}$ );  
 $C_{aq}$  est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot g^{-1}$ ,  $\mu g \cdot ml^{-1}$ ).



$K_f$  est le coefficient d'adsorption de Freundlich, défini comme la concentration de la substance d'essai dans le sol ou les boues d'épuration ( $x/m$ ) lorsque la concentration à l'équilibre ( $C_{aq}$ ) dans la phase aqueuse est égale à un. Il est exprimé en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de sorbant. Sa valeur peut varier en fonction des propriétés du sorbant. Il se calcule selon l'équation suivante:

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

où:

$x/m$  est la quantité de substance  $x$  ( $\mu\text{g}$ ) adsorbée sur la quantité de sorbant  $m$  ( $\text{g}$ ) à l'équilibre;  
 $1/n$  est la pente de l'isotherme d'adsorption de Freundlich ;  
 $C_{aq}$  est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

$$\text{Lorsque } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

$K_{oc}$  est le coefficient de distribution ( $K_d$ ) ou le coefficient d'adsorption de Freundlich ( $K_f$ ) normalisé basé sur la teneur en carbone organique ( $f_{oc}$ ) du sorbant. Plus particulièrement dans le cas des substances non-ionisées, il donne une approximation du degré d'adsorption d'une substance sur le sorbant et permet de faire des comparaisons entre différents produits chimiques. Dépendant de  $K_d$  et de  $K_f$ , il peut être sans unité ou s'exprimer en  $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$  ou en  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière organique.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} (\text{sans unité ou en } \text{ml}\cdot\text{g}^{-1}) \text{ ou } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) \quad (3)$$

Comme la relation entre  $K_{oc}$  et  $K_d$  n'est pas toujours linéaire, les valeurs de  $K_{oc}$  peuvent donc varier d'un sol à l'autre, mais leur variabilité est très réduite par rapport aux valeurs de  $K_d$  ou de  $K_f$ .

Le coefficient d'adsorption ( $K_{oc}$ ) se déduit du facteur de capacité ( $k'$ ) à partir de la courbe d'étalonnage de  $\log k'$  en fonction de  $\log K_{oc}$ , tracée pour les composés de référence sélectionnés. L'équation est la suivante:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

où:

$t_R$  est le temps de rétention de la substance d'essai et de la substance de référence dans la colonne de HPLC (en minutes);

$t_0$  est le temps mort dans la colonne de HPLC (en minutes) (voir paragraphe 1.8.2).

$P_{ow}$  est le coefficient de partage octanol/eau, défini comme le rapport des concentrations d'une substance dissoute dans l'eau et le n-octanol. Il est sans dimension.

$$P_{ow} = \frac{C_{oc \text{ tan ol}}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

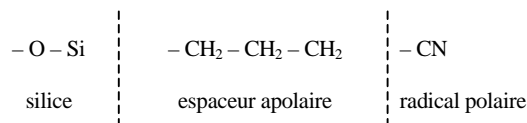
### 1.3 SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Avant d'utiliser cette méthode, il convient de connaître la formule développée, la pureté et, le cas échéant, la constante de dissociation des substances de référence. Il est également utile d'être renseigné sur leur solubilité dans l'eau et les solvants organiques, leur coefficient de partage octanol/eau ainsi que sur leurs caractéristiques d'hydrolyse.

Pour établir la corrélation entre les résultats expérimentaux de rétention en HPLC d'une substance d'essai et son coefficient d'adsorption  $K_{oc}$ , on doit tracer la courbe d'étalonnage de  $\log K_{oc}$  en fonction de  $\log k'$ . Il faudrait utiliser au minimum six points dont au moins un supérieur et un inférieur à la valeur supposée de la substance d'essai. La précision de la méthode sera d'autant plus grande que les substances de référence employées présenteront une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai. S'il n'est pas possible d'avoir ces données, l'utilisateur est libre de sélectionner les substances d'étalonnage les mieux adaptées. Il devrait alors opter pour une série plus générale de substances présentant une hétérogénéité de structure. Les substances et les valeurs de  $K_{oc}$  recommandées à l'usage sont indiquées en annexe, au tableau 1 pour les boues d'épuration et au tableau 3 pour les sols. Il y aura donc lieu de justifier le choix de toute autre substance d'étalonnage.

### 1.4 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La HPLC est réalisée sur des colonnes d'analyse dont la phase solide est composée de résines commerciales cyanopropyliques contenant des radicaux lipophiles et polaires. On utilise une phase stationnaire modérément polaire basée sur une matrice de silice:



Le principe de cette méthode d'essai est analogue à celui de la méthode d'essai A.8 (coefficient de partage, méthode par HPLC). La substance d'essai, en migrant dans la colonne contenant la phase mobile, interagit avec la phase stationnaire. La répartition de la substance entre la phase mobile et la phase stationnaire contribue à ralentir la progression. La composition de la phase stationnaire qui comporte à la fois des sites polaires et apolaires fait qu'une interaction est possible entre groupements polaires et radicaux apolaires d'une molécule – à l'instar de la matière organique dans des matrices de sol ou de boues d'épuration. On peut ainsi établir une relation entre le temps de rétention sur la colonne et le coefficient d'adsorption sur la matière organique.

Le pH exerce une influence significative, en particulier, sur le comportement de sorption des substances polaires. En règle générale, le pH varie entre 5,5 et 7,5 dans les sols agricoles et les bassins des stations de traitement des eaux usées. Les substances ionisables devraient être testées deux fois dans des solutions tampons appropriées, à savoir sous leur forme ionisée et non-ionisée, mais seulement si la dissociation du composé chimique atteint au moins 10 pour cent, à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5.

Comme l'évaluation se fonde exclusivement sur la relation entre la rétention sur la colonne de HPLC et le coefficient d'adsorption, il est inutile de faire appel à une méthode d'analyse quantitative, car seule la détermination du temps de rétention est nécessaire. A condition de disposer d'une série de substances de référence appropriées et d'appliquer des conditions expérimentales normalisées, cette méthode constitue un moyen rapide et efficace d'estimer le coefficient d'adsorption  $K_{oc}$ .

La méthode par HPLC convient aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe un système de détection approprié (spectrophotomètre ou détecteur de radioactivité, par exemple) et qui restent suffisamment stables tout au long de l'essai. Elle peut s'avérer particulièrement utile pour les substances difficiles à étudier dans d'autres systèmes expérimentaux (à savoir, les substances volatiles, les substances insolubles dans l'eau à une concentration mesurable par analyse et les substances présentant une très grande affinité avec la surface des récipients d'incubation). On peut également l'appliquer à des mélanges qui donnent des bandes d'éluion non résolues. Dans ce cas, il faut déterminer les valeurs limites supérieures et inférieures du  $\log K_{oc}$  des composants du mélange d'essai.

Les impuretés risquent parfois de compliquer l'interprétation des résultats de la HPLC, mais leur importance restera négligeable si la substance d'essai peut être clairement identifiée et séparée des impuretés par une méthode analytique.

Après avoir été validée pour les substances énumérées au tableau 1 de l'annexe, cette méthode a été appliquée à toute une série d'autres composés chimiques répertoriés dans les classes chimiques suivantes:

- amines aromatiques (exemples: trifluraline, 4-chloroaniline, 3,5-dinitro-aniline, 4-méthylaniline, N-méthylaniline, 1-naphthylamine);
- esters d'acides carboxyliques aromatiques (exemples: ester méthylique de l'acide benzoïque, 3,5-dinitrobenzoate d'éthyle);
- hydrocarbures aromatiques (exemples: toluène, xylène, éthylbenzène, nitrobenzène);
- esters de l'acide aryloxyphénoxypropionique (exemples: diclofop-méthyle, fénoxaprop-éthyle, fénoxaprop-P-éthyle);
- fongicides à base de benzimidazole ou d'imidazole (exemples: carbendazime, fubéridazole, triazoxyde);
- amides de l'acide carboxylique (exemples: 2-chlorobenzamide, N,N-diméthylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-méthylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide);
- hydrocarbures chlorés (exemples: endosulfan, DDT, hexachlorobenzène, quintozone, 1,2,3-trichlorobenzène);
- insecticides organo-phosphorés (exemples: azinphos-méthyle, disulfoton, phénamiphos, isophenphos, pyrazophos, sulprophos, triazophos);
- phénols (exemples: phénol, 2-nitrophénol, 4-nitrophénol, pentachlorophénol, trichloro-2,4,6-phénol, 1-naphtol);
- dérivés de la phénylurée (exemples: isoproturon, monolinuron, pencycuron);
- colorants pigmentaires (exemples: Acid yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- hydrocarbures aromatiques polycycliques (exemples: acénaphthène, naphthalène);
- herbicides à base de triazine-1,3,5 (exemples: prométryne, propazine, simazine, terbutryne);
- dérivés de triazole (exemples: tébuconazole, triadiméfon, tradiménol, triapenthénol).

Cette méthode ne convient pas aux substances réagissant avec l'éluant ou la phase stationnaire. Par ailleurs, elle n'est pas applicable aux substances qui interagissent de manière spécifique avec des constituants inorganiques (formation de complexes en grappe avec les minéraux argileux, par exemple). Elle risque d'être inopérante pour les produits tensio-actifs, les substances inorganiques ainsi que les acides et bases modérés à forts. Elle permet de déterminer des valeurs de  $\log K_{oc}$  comprises entre 1,5 et 5,0. Les substances ionisantes doivent être mesurées dans une phase mobile tamponnée, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la précipitation des composants du tampon ou de la substance d'essai.

## 1.6 CRITÈRES DE QUALITÉ

### 1.6.1 Précision

En règle générale, le coefficient d'adsorption d'une substance d'essai peut être estimé à  $\pm 0,5$  unités logarithmiques de la valeur déterminée d'après la méthode par agitation (voir au tableau 1 de l'annexe). Il est possible d'atteindre une plus grande précision si les substances de référence utilisées présentent une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai.

### 1.6.2 Répétabilité

Toutes les analyses doivent être répétées au moins deux fois. Les valeurs du  $\log K_{oc}$  calculées à partir de résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unités log.

### 1.6.3 Reproductibilité

L'expérience acquise jusqu'à présent en appliquant la méthode d'essai par HPLC vient en corroborer la validité. A l'issue d'une étude expérimentant 48 substances (en majorité des pesticides) pour lesquelles existaient des données fiables concernant le  $K_{oc}$  sur des sols, on a obtenu un coefficient de corrélation:  $R = 0,95$  (10) (11).

Un essai comparatif inter-laboratoires conduit par 11 laboratoires a permis d'améliorer et de valider la méthode (12). Tous les résultats sont reproduits au tableau 2 de l'annexe.

## 1.7 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

### 1.7.1 Estimation préliminaire du coefficient d'adsorption

Le coefficient de partage octanol/eau  $P_{ow}$  ( $= K_{ow}$ ) et, dans une certaine mesure, l'hydrosolubilité peuvent servir d'indicateurs du degré d'adsorption, en particulier, pour les substances non-ionisées. Ils permettent donc une première approximation des ordres de grandeur. Une série de corrélations utiles ont été publiées concernant plusieurs classes de produits chimiques (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

### 1.7.2 Appareillage

L'appareillage doit nécessairement comprendre un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe sans pulsations et d'un système de détection adapté. Il est recommandé d'utiliser une boucle d'injection munie d'une valve d'injection. Il faut employer des résines commerciales cyanopropyliques liées chimiquement sur une base de silice (Hypersil ou Zorbax CN, par exemple). Une colonne de garde du même matériau peut être insérée entre le système d'injection et la colonne d'analyse. La puissance de séparation des colonnes d'analyse est susceptible de varier énormément d'un fournisseur à l'autre. A titre indicatif, il faudrait atteindre les facteurs de capacité ( $k'$ ) suivants:  $\log k' > 0,0$  pour  $\log K_{oc} = 3,0$  et  $\log k' > -0,4$  pour  $\log K_{oc} = 2,0$ , en utilisant une phase mobile méthanol/eau 55/45 pour cent .

### 1.7.3 Phases mobiles

Après avoir testé différentes phases mobiles, on recommande les deux suivantes:

- méthanol/eau (55/45 pour cent v/v),
- méthanol/solution tampon de citrate 0,01M à pH 6,0 (55/45 pour cent v/v).

Le solvant d'éluion est préparé à partir de méthanol de qualité HPLC et d'eau distillée ou d'un tampon citrate. Le mélange est dégazé avant emploi. Il est préférable d'effectuer une éluion isocratique. Si les mélanges méthanol/eau sont contre-indiqués, on peut essayer d'autres mélanges de solvant organique/eau, à savoir éthanol/eau ou acétonitrile/eau. Dans le cas de composés ionisants, il est recommandé d'utiliser une solution tampon afin de stabiliser le pH. Il faut veiller à éviter que les sels ne précipitent ou que la colonne ne se détériore, ce qui risque de se produire avec certains mélanges de phase organique/tampon.

On s'abstiendra d'utiliser des additifs tels que des réactifs à paires d'ions, car ils risquent d'affecter les propriétés sorbantes de la phase stationnaire. Vu que des modifications de cette nature dans la phase stationnaire risquent d'être irréversibles, il est impératif d'effectuer les analyses comportant ce type d'additifs sur des colonnes séparées.

### 1.7.4 Solutés

Les substances de référence et d'essai doivent être dissoutes dans la phase mobile.

## 1.8 RÉALISATION DE L'ESSAI

### 1.8.1 Conditions expérimentales

On doit enregistrer la température pendant les mesures. Il est fortement recommandé d'utiliser une colonne placée dans une enceinte thermorégulée, afin de garantir des conditions de température constantes pendant les différents cycles d'étalonnage et d'évaluation et la mesure de la substance d'essai.

### 1.8.2 Détermination du temps mort $t_0$

On peut utiliser deux méthodes pour déterminer le temps mort  $t_0$  (voir également au paragraphe 1.2).

#### 1.8.2.1 *Détermination du temps mort $t_0$ au moyen d'une série homologue*

Cette procédure a montré qu'il est possible d'obtenir des valeurs de  $t_0$  harmonisées et fiables. Pour sa description, il faut se reporter à la Méthode d'Essai A.8 "Coefficient de partage n-octanol/eau et méthode d'analyse par HPLC".

#### 1.8.2.2 *Détermination du temps mort $t_0$ par des substances inertes non retenues sur la colonne*

Cette technique met en jeu l'injection de solutions de formamide, d'urée ou de nitrate de sodium. Il convient de répéter les mesures au moins deux fois.

### 1.8.3 Détermination des temps de rétention $t_R$

Les substances de référence doivent être sélectionnées selon les indications du paragraphe 1.3. Pour déterminer leur temps de rétention, on peut les injecter sous la forme d'un étalon composite, à condition d'avoir vérifié au préalable que le temps de rétention de chaque étalon n'est pas influencé par la présence des autres étalons de référence. Il faudrait procéder à un étalonnage à intervalles réguliers, au moins deux fois par jour, pour tenir compte de toute variation imprévue dans le fonctionnement de la colonne. Pour la bonne règle, il est préférable d'injecter les étalons avant et après la substance d'essai pour s'assurer que les temps de rétention n'ont pas évolué. On injecte chaque substance d'essai séparément dans des proportions aussi faibles que possible (ce qui évite de surcharger la colonne), puis on détermine son temps de rétention.

Afin d'accroître la fiabilité des mesures, toutes les déterminations doivent être effectuées au moins en double. Les valeurs de  $\log K_{oc}$  déduites des résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unités  $\log$ .

### 1.8.4 Évaluation

Les facteurs de capacité  $k'$  sont calculés à partir du temps mort  $t_0$  et des temps de rétention  $t_R$  des substances de référence selon l'équation 4 (voir au paragraphe 1.2). Les valeurs de  $\log k'$  des substances de référence sont ensuite portées sur une courbe graphique en fonction des valeurs de leur  $\log K_{oc}$  extraites des essais par agitation dont les résultats figurent aux tableaux 1 et 3 de l'annexe. À l'aide de cette courbe, la valeur du  $\log K_{oc}$  d'une substance d'essai est calculée à partir de son  $\log k'$ . Si les résultats expérimentaux montrent que le  $\log K_{oc}$  de la substance sort de l'intervalle des valeurs d'étalonnage, il convient de recommencer l'essai en employant d'autres substances de référence plus appropriées.

## 2. PRÉSENTATION DES DONNÉES

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

- identité, degré de pureté et, le cas échéant, valeurs de  $pK_a$  des substances d'essai et de référence;
- description des matériels utilisés et des conditions expérimentales, en indiquant le type et les dimensions de la colonne d'analyse (et de la colonne de garde), du dispositif de détection, de la phase mobile (rapport des composants et pH), de la plage des températures pendant les mesures;
- temps mort et méthode appliquée pour l'évaluer;
- quantités de substances de référence et d'essai injectées dans la colonne;
- temps de rétention des composés de référence employés pour l'étalonnage;
- détails de la courbe de régression ajustée ( $\log k'$  en fonction de  $\log K_{oc}$ ) et représentation graphique de cette courbe;
- valeurs moyennes de rétention et valeur estimée du  $\log K_{oc}$  de la substance d'essai;
- chromatogrammes.

3.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

ANNEXE

**Tableau 1**

Comparaison entre les valeurs de  $K_{oc}$  sur les sols et les boues d'épuration et les valeurs calculées suivant la méthode de sélection par HPLC <sup>1,2</sup>

Type de substance	N° CAS	log $K_{oc}$ pour boues d'épuration	log $K_{oc}$ par HPLC	$\Delta$	log $K_{oc}$ pour sols	log $K_{oc}$ par HPLC	$\Delta$
Atrazine	1912-24-9	1.66	2.14	0.48	1.81	2.20	0.39
Linuron	330-55-2	2.43	2.96	0.53	2.59	2.89	0.30
Fenthion	55-38-9	3.75	3.58	0.17	3.31	3.40	0.09
Monuron	150-68-5	1.46	2.21	0.75	1.99	2.26	0.27
Phénanthrène	85-01-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Benzoate de phényle	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Benzamide	55-21-0	1.60	1.00	0.60	1.26	1.25	0.01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
Acétanilide	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
Aniline	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2.45	2.59	0.14	2.55	2.58	0.03

<sup>1</sup> W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 - 128.

<sup>2</sup> W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

**Tableau 2**

Résultats des essais comparatifs inter-labos (11 laboratoires participants) en vue d'améliorer et de valider la méthode par HPLC<sup>1</sup>

Type de substance	N° CAS	log $K_{oc}$ [OCDE 106]	$K_{oc}$	log $K_{oc}$
			[méthode par HPLC]	
Atrazine	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuron	150-68-5	1.99	100 ± 8	2.00
Triapenthénol	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuron	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fenthion	55-38-9	3.31	2062 ± 648	3.31

<sup>1</sup> W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.



**Tableau 3**

**Substances de référence recommandées pour des essais de sélection par HPLC d'après des données relatives à l'adsorption sur les sols**

Substance de référence	N° CAS	Valeurs moyennes de log K <sub>oc</sub> d'après méthode par agitation	Nombre de résultats pour le K <sub>oc</sub>	Écart-type du log	source
Acétanilide	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Phénol	108-95-2	1.32	4	0.70	a
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1.45	3	0.90	b
N,N-diméthylbenzamide	611-74-5	1.52	2	0.45	a
4-Méthylbenzamide	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Benzoate de méthyle	93-58-3	1.80	4	1.08	a
Atrazine	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Aniline	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2.31	3	1.27	b
Carbendazime	10605-21-7	2.35	3	1.37	c
Triadimérol	55219-65-3	2.40	3	1.85	c
Triazoxyde	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
Triazophos	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Naphtalène	91-20-3	2.75	4	2.20	a
Endosulfane-diol	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Méthiocarbe	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-Trichlorobenzène	87-61-6	3.16	4	1.40	a
γ-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fenthion	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyrazophos	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
α-Endosulfane	959-98-8	4.09	5	3.74	c
Diclofop-méthyle	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Phénanthrène	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT	50-29-3	5.63	1	–	b

- /a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
- /b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
- /c/ Données communiqués par les industriels.

## C.20 DAPHNIA MAGNA, ESSAI DE REPRODUCTION

### 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de reproduction reprend la ligne directrice n° 211 de l'OCDE (1998).

#### 1.1 INTRODUCTION

Le principal objectif de l'essai consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur la capacité reproductrice de *Daphnia magna*.

#### 1.2 DÉFINITIONS ET UNITÉS

**Animaux parents** : *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai et dont la capacité reproductrice représente l'objet de cette étude.

**Descendants** : jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

**Concentration minimale avec effet observé (CMEO)** : concentration d'essai la plus basse à laquelle on a observé un effet statistiquement significatif de la substance sur la reproduction et la mortalité des animaux parents (à  $p < 0,05$ ) par rapport au témoin, durant une période d'exposition définie. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

**Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO)** : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à  $p < 0,05$ ), durant une période d'exposition définie.

**CE<sub>x</sub>** : concentration de la substance d'essai dissoute dans l'eau qui entraîne une diminution de x pour cent de la reproduction chez *Daphnia magna*, durant une période d'exposition définie.

**Taux intrinsèque d'accroissement** : mesure de l'accroissement de la population qui intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge (20) (21) (22). Cette valeur est nulle dans les populations à l'état stationnaire, positive dans les populations en croissance et négative dans les populations qui régressent. Cette dernière catégorie de population n'est évidemment pas durable et est vouée en fin de compte à l'extinction.

**Limite de détection** : la plus basse concentration susceptible d'être détectée, mais non chiffrée.

**Limite de détermination** : la plus basse concentration susceptible d'être mesurée quantitativement.

**Mortalité** : un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans les 15 secondes qui suivent l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, celle-ci doit être stipulée avec sa référence).

### 1.3 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

De jeunes femelles de *Daphnia* (les animaux parents), âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai ajoutée à l'eau à différentes concentrations. L'essai dure 21 jours. A la fin de l'essai, le nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai est évalué. La capacité reproductrice des animaux parents peut s'exprimer autrement (par exemple, par le nombre de descendants vivants produits par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés), mais ces résultats doivent être fournis en plus du nombre total de juvéniles engendrés par parent survivant à la fin de l'essai. La capacité reproductrice des animaux exposés à la substance d'essai est comparée à celle des témoins, afin de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CME0) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). De plus, dans toute la mesure du possible, les résultats sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, en vue d'estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x pour cent de la capacité reproductrice, c'est-à-dire la  $CE_x$  (par exemple,  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  ou  $CE_{10}$ ).

Il faut aussi indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première portée. D'autres effets liés à la substance sur des paramètres tels que la croissance (par exemple, la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés.

### 1.4 INFORMATIONS CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

Les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir Méthode C.2, Partie I) réalisé sur *Daphnia magna* devraient être disponibles. Ces résultats peuvent être utiles pour sélectionner une plage de concentrations d'essai adaptée aux essais de reproduction. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Il faudrait pouvoir disposer d'une méthode d'analyse fiable, dont le rendement et la limite de détermination sont connus, pour doser la substance dans les solutions d'essai.

Des informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/eau ( $P_{oe}$ ) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir Méthode C.4).

### 1.5 VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valable, les témoins doivent remplir les critères de performance suivants :

- la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne dépasse pas 20 pour cent à la fin de l'essai ;
- le nombre moyen de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai est  $\geq 60$ .

### 1.6 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

#### 1.6.1 Appareillage

Les récipients d'essai et les autres dispositifs qui entreront en contact avec les solutions d'essai doivent être entièrement en verre ou constitués d'une autre matière chimiquement inerte. On utilisera en principe des béchers en verre.

En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant :

- un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume);
- un thermostat adéquat;
- un pH-mètre;
- un appareil pour mesurer la dureté de l'eau;
- un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO) ;
- un dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.

### 1.6.2 Organisme d'essai

L'espèce à utiliser dans cet essai est *Daphnia magna* Straus. D'autres espèces de *Daphnia* peuvent être utilisées à condition qu'elles remplissent les critères de validité pertinents (ceux qui concernent la capacité reproductrice des témoins doivent s'appliquer aux espèces de *Daphnia*). Si d'autres espèces de *Daphnia* sont utilisées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier leur utilisation.

Le clone devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. La recherche (1) a montré que la capacité reproductrice du clone A (originaire de l'IRCHA, en France) (3) répond de façon stable au critère de validité qui stipule une moyenne de  $\geq 60$  descendants par animal parent survivant, lorsqu'il est élevé dans les conditions décrites dans la présente méthode. D'autres clones sont toutefois acceptables à condition de prouver que la culture de *Daphnia* remplit les critères de validité pour l'essai.

Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de moins de 24 heures et ne peuvent pas provenir d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les *Daphnia*, il convient de laisser aux *Daphnia* une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure habituellement quelque trois semaines (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

### 1.6.3 Milieu d'essai

Il est recommandé d'utiliser un milieu entièrement défini dans cet essai. Cela permet d'éviter le recours aux additifs (par exemple, algues, extraits de sol, etc.), qui sont difficiles à caractériser, et d'améliorer ainsi les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elendt M4 (4) et M7 (voir annexe 1) se sont avérés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables (par exemple (5) et (6)), à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci devraient être spécifiés clairement et le rapport d'essai devrait comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est souhaitable que les concentrations de COT du milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) soient inférieures à 2 mg/l (7).

Lorsque l'on teste des substances contenant des métaux, il est important de savoir que les propriétés du milieu d'essai (par exemple, la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent influencer sur leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *Daphnia magna* sont Elendt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélateur EDTA. Des travaux ont montré (2) que la "toxicité apparente" du cadmium est généralement inférieure lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7, que dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour tester des substances contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélateurs connus. Il est souhaitable d'utiliser un autre milieu pour les substances renfermant des métaux, par exemple l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (7), qui ne contient pas d'EDTA, additionnée d'un extrait d'algues (8). La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues convient également aux essais et aux cultures à long terme de *Daphnia magna* (2), bien qu'elle exerce encore une légère action chélatante à cause des matières organiques contenues dans l'extrait d'algues.

Au début de l'essai et durant celui-ci, la concentration d'oxygène dissous devrait être supérieure à 3 mg/l. Le pH devrait être compris entre 6 et 9, et ne devrait normalement pas varier de plus de 1,5 unités au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (en CaCO<sub>3</sub>) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est avérée conforme aux critères de validité (9) (10).

#### 1.6.4 Solutions d'essai

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Les solutions mères devraient, de préférence, être préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

Le recours à des dispersants ou solvants organiques peut quelquefois s'avérer nécessaire pour obtenir une solution mère à la concentration voulue, mais ces additifs doivent être évités dans toute la mesure du possible. Voici quelques exemples de solvants adéquats : acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Parmi les dispersants recommandables, citons le Cremophor RH40, la méthylcellulose à 0,01 pour cent et le HCO-40. En tout état de cause, la substance d'essai ne doit pas être testée au-delà de sa limite de solubilité dans le milieu d'essai.

Les solvants sont employés pour confectionner une solution mère qui peut être dosée avec précision dans l'eau. Les solvants énumérés ci-dessus, utilisés à la concentration recommandée dans le milieu d'essai final ( $\leq 0,1$  ml/l), ne seront pas toxiques et n'augmenteront pas la solubilité de la substance dans l'eau.

Les dispersants peuvent faciliter le dosage précis et la dispersion. À la concentration recommandée dans le milieu d'essai final ( $\leq 0,1$  ml/l), les dispersants mentionnés ci-dessus ne seront pas toxiques et n'augmenteront pas la solubilité de la substance dans l'eau.

#### 1.7 CONCEPTION DE L'ESSAI

Les traitements sont répartis dans les récipients d'essai, et toutes les manipulations ultérieures de ces récipients sont réalisées dans un ordre aléatoire, faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures. En outre, si les résultats de l'essai sont susceptibles d'être affectés par une condition initiale ou liée à l'environnement, comme la situation dans le laboratoire, il conviendra d'envisager un plan en blocs.

#### 1.8 MODE OPÉRATOIRE

##### 1.8.1 Conditions d'exposition

###### 1.8.1.1 *Durée*

L'essai dure 21 jours.

###### 1.8.1.2 *Charge*

Les animaux parents sont répartis individuellement dans les récipients d'essai contenant chacun 50-100 ml de milieu.

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus importants, afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration de la substance d'essai, bien qu'il soit aussi possible de mélanger les récipients de même concentration aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 ml sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux *Daphnia*, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits. S'agissant des essais dynamiques, d'autres protocoles peuvent être envisagés pour des raisons techniques (par exemple, quatre groupes de 10 animaux dans des volumes expérimentaux plus élevés), mais toute modification du mode opératoire doit être signalée.

#### 1.8.1.3 *Nombre d'animaux*

Pour les essais semi-statiques, on utilisera au moins 10 animaux répartis individuellement à chaque concentration d'essai et au moins 10 animaux répartis individuellement dans la série de témoins.

Pour les essais dynamiques, il s'avère approprié d'utiliser 40 animaux répartis en quatre groupes de 10 à chaque concentration d'essai (1). Un plus petit nombre d'animaux d'expérience peut être utilisé, mais on recommande d'employer au moins 20 animaux par concentration, répartis dans au moins deux récipients contenant le même nombre d'animaux (par exemple, quatre récipients contenant cinq daphnies chacun). Notons que pour les essais où les animaux sont maintenus en groupe, il ne sera pas possible d'exprimer la capacité reproductrice en fonction du nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai, si des animaux parents meurent. Auquel cas, il faudra exprimer la capacité reproductrice par "le nombre total de descendants vivants produits par parent présent au début de l'essai".

#### 1.8.1.4 *Alimentation*

Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins tri-hebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Les écarts par rapport à cette fréquence (par exemple, dans les essais dynamiques) doivent être signalés.

Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents devrait, de préférence, se composer d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs des espèces suivantes : *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* [renommée *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] et *Scenedesmus subspicatus*. La nourriture devrait être dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (12) a montré que pour *Daphnia magna*, des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisaient pour produire le nombre de descendants requis selon les critères de validité. On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai ou utiliser des teneurs plus faibles au début, que l'on augmentera afin de tenir compte de la croissance des animaux parents. Dans ce cas, la ration devrait toujours contenir entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour, qui est la teneur recommandée.

Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (pour des raisons pratiques, car la mesure de la teneur en carbone prend beaucoup de temps), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme mettant en relation le paramètre de remplacement et la teneur en carbone de la culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'annexe 2). Les nomogrammes devraient être vérifiés au moins une fois par an, et plus souvent si les conditions de culture des algues ont changé. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (13).

Il convient d'administrer une suspension d'algues concentrée aux *Daphnia*, afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. On peut concentrer les algues par centrifugation, puis remise en suspension dans de l'eau distillée, de l'eau désionisée ou le milieu de culture des *Daphnia*.

#### 1.8.1.5 *Lumière*

16 heures de lumière à une intensité ne dépassant pas  $15\text{-}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 1.8.1.6 *Température*

La température des milieux d'essai devrait être comprise entre 18 et 22°C. Néanmoins, dans un même essai, la température ne devrait pas, si possible varier de plus de 2°C au sein de cet intervalle (par exemple, 18-20, 19-21 ou 20-22°C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

#### 1.8.1.7 *Aération*

Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai.

### 1.8.2 Concentrations d'essai

Il faudrait normalement utiliser au moins cinq concentrations d'essai formant une série géométrique, de préférence espacées d'un facteur n'excédant pas 3,2. Il convient d'utiliser un nombre approprié de répliques pour chaque concentration d'essai (voir paragraphe 1.8.1.3). L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans le milieu d'essai.

Lors de la détermination de la plage de concentrations, il convient de tenir compte des éléments suivants :

- i. Si l'on cherche à déterminer la CMEO et la CSEO, la plus faible concentration testée doit être suffisamment basse pour que le taux de fécondité à cette concentration ne soit pas significativement plus bas que celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il faudra recommencer l'essai en abaissant la concentration la plus basse.
- ii. Si l'on cherche à déterminer la CMEO et la CSEO, la plus forte concentration testée devra être suffisamment élevée pour que le taux de fécondité à cette concentration soit significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il faudra recommencer l'essai en augmentant la concentration la plus forte.
- iii. Si l'on veut estimer la  $CE_x$  relative aux effets sur la reproduction, il est conseillé d'utiliser des concentrations suffisantes pour définir cette  $CE_x$  avec un niveau de confiance satisfaisant. Si l'on évalue la  $CE_{50}$  relative aux effets sur la reproduction, il est souhaitable que la concentration d'essai la plus forte soit supérieure à cette  $CE_{50}$ . Si tel n'est pas le cas, on pourra toujours estimer la  $CE_{50}$ , mais l'intervalle de confiance sera très large et on risque de ne pas être en mesure d'évaluer la pertinence du modèle.
- iv. Il vaut mieux éviter d'inclure dans la plage des concentrations d'essai celles qui ont un effet statistiquement significatif sur la survie des adultes, parce que, ce faisant, on modifierait la nature de l'essai qui passerait d'un simple essai de reproduction à un essai combiné de reproduction et de mortalité, ce qui exige une analyse statistique bien plus complexe.

Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (résultant d'une étude de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter la sélection de concentrations d'essai pertinentes.

Lorsqu'un solvant ou un dispersant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir paragraphe 1.6.4), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

### 1.8.3 Témoins

Il faudrait tester une série de témoins du milieu d'essai et, le cas échéant, une série de témoins contenant le solvant ou le dispersant, parallèlement aux séries traitées avec la substance d'essai. Le cas échéant, la concentration du solvant ou du dispersant doit être identique à celle utilisée dans les récipients contenant la substance d'essai. Il convient d'utiliser un nombre approprié de répliques (voir paragraphes 1.8.1.3).

Généralement, dans un essai correctement mené, le coefficient de variation autour du nombre moyen de descendants vivants produits par animal parent dans le ou les groupes témoins devrait être  $\leq 25\%$ , et cette information doit être communiquée pour les essais où les animaux sont maintenus dans des récipients individuels.

### 1.8.4 Renouvellement du milieu d'essai

La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais devrait être au moins tri-hebdomadaire. Si les essais préliminaires de stabilité (voir paragraphe 1.4) montrent que la concentration de la substance d'essai n'est pas stable (c'est-à-dire en dehors de la fourchette de 80 - 120 % de la concentration nominale ou inférieure à 80 % de la concentration initiale mesurée) durant la période de renouvellement la plus longue (3 jours), il faut envisager de renouveler le milieu plus fréquemment ou de pratiquer un essai dynamique.

Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Le volume de milieu transféré avec les *Daphnia* doit être le plus petit possible.



#### 1.8.5 **Observations**

Les résultats des observations effectuées durant l'essai doivent être consignés dans des fiches de données (voir exemples aux annexes 3 et 4). Si d'autres mesures s'imposent (voir paragraphes 1.3 et 1.8.8), des observations supplémentaires pourront être requises.

#### 1.8.6 **Descendants**

Les descendants engendrés par chaque animal parent devraient de préférence être retirés et comptés quotidiennement, dès la première portée, pour ne pas qu'ils consomment la nourriture destinée aux adultes. Aux fins de la présente méthode, il ne faut compter que les descendants vivants, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts doit être signalée.

#### 1.8.7 **Mortalité**

La mortalité des animaux parents doit être notée, de préférence quotidiennement, et au moins à chaque comptage des descendants.

#### 1.8.8 **Autres paramètres**

Bien que la présente méthode vise avant tout à évaluer les effets sur la reproduction, il se peut que d'autres effets soient suffisamment quantifiés pour se prêter à l'analyse statistique. La mesure de la croissance est très intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur les éventuels effets sublétaux, ce qui peut se révéler plus utile que les seules données de reproduction. On préconise de mesurer la longueur des animaux parents (la longueur du corps sans l'épine anale) à la fin de l'essai. D'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés : le moment de la première portée (et des portées suivantes), le nombre et la taille des portées par animal, le nombre de portées avortées, la présence de mâles ou d'éphippies et, éventuellement, le taux intrinsèque d'accroissement de la population.

#### 1.8.9 **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

La concentration d'oxygène, la température, la dureté et le pH doivent être mesurés au moins une fois par semaine, avant et après le renouvellement des milieux, chez les témoins et dans les récipients qui renferment la concentration la plus élevée de la substance d'essai.

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration de la substance d'essai ne s'écartera pas de plus de 20 % de la concentration nominale (c'est-à-dire qu'elle restera comprise dans un intervalle de 80 à 120 % - voir paragraphes 1.4 et 1.8.4), on recommande, au minimum, d'analyser les concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse juste après leur préparation et au moment de leur renouvellement au cours de la première semaine de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, juste après la préparation de la solution et au moment du renouvellement). Ces déterminations devraient ensuite être répétées selon une fréquence au moins hebdomadaire.

S'agissant des essais où la concentration n'est pas supposée demeurer dans un intervalle de  $\pm 20$  % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, juste après leur préparation et au moment du renouvellement. Cependant, pour les essais où la concentration initiale mesurée de la substance d'essai sort de l'intervalle de  $\pm 20$  % de la concentration nominale, mais pour lesquels on peut montrer de façon suffisamment convaincante que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire comprises dans un intervalle de 80 à 120 % des concentrations initiales), les déterminations chimiques pourraient se limiter durant les deuxième et troisième semaines aux concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse. En tout état de cause, la détermination de la concentration de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être effectuée que sur une seule réplique de chaque concentration d'essai.

Si on pratique un essai dynamique, il convient de recourir à un régime de prélèvements identique à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais l'analyse des solutions "anciennes" ne s'applique pas ici). Toutefois, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements durant la première semaine (par exemple, trois séries de mesures) afin de vérifier la stabilité des concentrations d'essai. Dans ces types d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai doivent être contrôlés chaque jour.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu être correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration initiale mesurée ou nominale, les résultats peuvent être déduits des valeurs initiales mesurées ou nominales. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à  $\pm 20\%$ , les résultats devraient être exprimés par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir annexe 5).

## 2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### 2.1 **TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

L'objectif de cet essai est de déterminer l'effet de la substance à tester sur le nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai. Le nombre total de descendants par animal parent doit être calculé pour chaque récipient d'essai (autrement dit, pour chaque récipient de même concentration). Si, dans un récipient, un animal parent meurt durant l'essai ou se révèle être un mâle, ce récipient est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de récipients de même concentration.

Pour l'estimation de la CMEO et, par conséquent, de la CSEO relatives aux effets du produit chimique sur la capacité reproductrice, il est nécessaire de calculer la moyenne de la capacité reproductrice à chaque concentration pour tous les récipients, ainsi que l'écart-type résiduel groupé, et ce calcul peut être effectué à l'aide de l'analyse de la variance. La moyenne pour chaque concentration doit ensuite être comparée à la moyenne pour les témoins, par une méthode appropriée de comparaisons multiples. Les tests de Dunnett ou de Williams peuvent convenir (14) (15) (16) (17). Il est nécessaire de vérifier l'hypothèse (de l'analyse de la variance) concernant l'homogénéité de la variance. On recommande d'effectuer cette vérification sur un graphique plutôt que par un test formel de signification (18) ; le test de Barlett convient également. Si cette hypothèse n'est pas vérifiée, il faut envisager de transformer les résultats afin d'homogénéiser les variances avant d'effectuer l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse de la variance pondérée. La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance (c'est-à-dire la plus petite différence significative) devrait être calculée et figurée dans le rapport.

Pour estimer la concentration qui provoquerait une réduction de 50 pour cent de la capacité reproductrice ( $CE_{50}$ ), une courbe adéquate, comme la courbe logistique, devrait être ajustée aux résultats au moyen d'une méthode statistique telle que les moindres carrés. La courbe pourrait être paramétrée de manière que la  $CE_{50}$  et son écart-type puissent être estimés directement. Cela faciliterait considérablement le calcul des limites de confiance de la  $CE_{50}$ . À moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, il convient d'opter pour des limites de confiance de 95 % de part et d'autre. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Cela peut se faire graphiquement ou en recherchant la part du manque d'ajustement et la part des erreurs proprement dites dans la somme des carrés des résidus et en pratiquant un test de signification pour le manque d'ajustement. Comme les traitements qui entraînent un taux de fécondité élevé sont susceptibles de donner lieu à une plus grande variance dans le nombre de juvéniles produits que les traitements diminuant le taux de fécondité, il faudrait envisager de pondérer les valeurs observées afin de refléter les diverses variances dans les différents groupes traités (voir référence 18).

Dans l'analyse des données obtenues à partir de l'essai tournant final (2), une courbe logistique a été ajustée à l'aide du modèle suivant, mais d'autres modèles conviennent également :

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

où :

Y est le nombre total de juvéniles par animal parent survivant à la fin de l'essai (calculé pour chaque récipient),

x est la concentration de la substance,

c est le nombre escompté de juvéniles lorsque x = 0

$x_0$ : la  $CE_{50}$  dans la population

b = paramètre caractérisant la pente

Ce modèle devrait convenir dans un grand nombre de situations, mais pas dans toutes. Il faudrait vérifier la validité du modèle comme indiqué ci-dessus. Dans certains cas, il pourrait être approprié d'utiliser un modèle d'hormèse dans lequel les basses concentrations donnent des effets plus marqués (19).

D'autres effets liés à la concentration, comme la  $CE_{10}$  ou la  $CE_{20}$ , peuvent également être estimés, mais il faudra probablement paramétrer le modèle autrement que dans le cas de la  $CE_{50}$ .

## 2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes :

### 2.2.1 Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

### 2.2.2 Espèce d'expérience :

- clone (préciser si son génotype a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si on utilise une espèce autre que *Daphnia magna*, il faut le signaler et le justifier.

### 2.2.3 Conditions d'essai :

- mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume, charge en nombre de *Daphnia* par litre) ;
- photopériode et intensité lumineuse ;
- plan de l'essai (par exemple, nombre de récipients de même concentration, nombre de parents par récipient) ;
- détails du milieu de culture employé ;
- le cas échéant, ajout de matière organique (préciser la composition, la source, la méthode de préparation, le COT et la DCO des solutions mères, une estimation du COT et de la DCO résultants dans le milieu d'essai) ;
- informations détaillées concernant l'alimentation, notamment quantité (en mg de C/*Daphnia*/jour) et programme (par exemple, type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant doivent être indiquées, le cas échéant).

#### 2.2.4 Résultats :

- résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai;
- concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai (l'annexe 4 fournit des exemples de fiches de données); le rendement de la méthode et sa limite de détermination devraient aussi être mentionnés;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (pH, température, concentration d'oxygène dissous, COT et/ ou DCO et dureté, le cas échéant) (l'annexe 3 fournit un exemple de fiche de données);
- dénombrement complet des descendants vivants de chaque animal parent (voir exemple de fiche de données à l'annexe 3);
- nombre et dates des décès chez les animaux parents (voir exemple de fiche de données à l'annexe 3);
- coefficient de variation de la fécondité chez les témoins (en fonction du nombre total de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai);
- graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent survivant (pour chaque récipient de même concentration) à la fin de l'essai, en fonction de la concentration de la substance d'essai;
- concentration minimale avec effet observé (CMEO) sur la reproduction, y compris une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui a pu être détecté, et concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) sur la reproduction; s'il y a lieu, mentionner également la CMEO et la CSEO sur la mortalité des animaux parents;
- s'il y a lieu,  $CE_x$  pour la reproduction et intervalles de confiance, ainsi qu'un graphique du modèle ajusté employé pour ces calculs, la pente de la courbe dose-effet et son écart-type;
- autres effets biologiques observés ou mesurés : indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (par exemple, croissance des animaux parents) avec justification appropriée, le cas échéant;
- justification de tout écart par rapport la présente méthode d'essai.

### 3. BIBLIOGRAPHIE

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 257-265 (1995).
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/ 600/ 4-90/ 027F. C. I. Weber (éd), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 775-782.

- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.
- 13) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459- 466
- 14) Dunnett C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- 15) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- 16) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, 103-117.
- 17) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics, 28, 510-531.
- 18) Draper, N. R. et Smith, H (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, N.Y.
- 19) Brain, P. et Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

## ANNEXE 1

### PRÉPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTièrement DÉFINIS

#### Acclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (1) et M7. Ils ont toutefois obtenu certains résultats en procédant à une acclimatation progressive, c'est-à-dire en transférant les animaux de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

#### PRÉPARATION

##### Éléments en traces

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

Solutions mères I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau mg/l	Concentratio n (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau ml/l	
			M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000 fois	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	7 210	20 000 fois	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 fois	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 fois	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 040	20 000 fois	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 fois	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 260	20 000 fois	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	335	20 000 fois	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000 fois	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	200	20 000 fois	1,0	1,0
KI	65	20 000 fois	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43.8	20 000 fois	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11.5	20 000 fois	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	5 000	2 000 fois	–	–
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1 991	2 000 fois	–	–
Les solutions de Na <sub>2</sub> EDTA et de FeSO <sub>4</sub> sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne :				
Solution 21 Fe-		1 000 fois	20,0	5,0

EDTA				
------	--	--	--	--



### Milieux M4 et M7

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

	Quantité ajoutée à l'eau mg/l	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère ajoutée pour préparer le milieu ml/l	
			M4	M7
Solution mère II (combinaison de substances en trace)		20 fois	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1 000 fois	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	246 600	2 000 fois	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 fois	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000 fois	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> * 9 H <sub>2</sub> O	50 000	5 000 fois	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000 fois	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000 fois	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	10 000 fois	0,1	0,1
Solution mère de vitamines combinées	-	10 000 fois	0,1	0,1
La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci- dessous :				
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois	-	-
Cyanocobalamine (B <sub>12</sub> )	10	10 000 fois	-	-
Biotine	7,5	10 000 fois	-	-

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

**N.B.** Afin d'éviter la précipitation des sels lors de la préparation du milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500-800 ml d'eau désionisée et amener le volume à 1 litre.

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

## ANNEXE 2

### ANALYSE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT) ET ÉTABLISSEMENT D'UN NOMOGRAMME POUR LA TENEUR EN COT DES ALIMENTS À BASE D'ALGUES

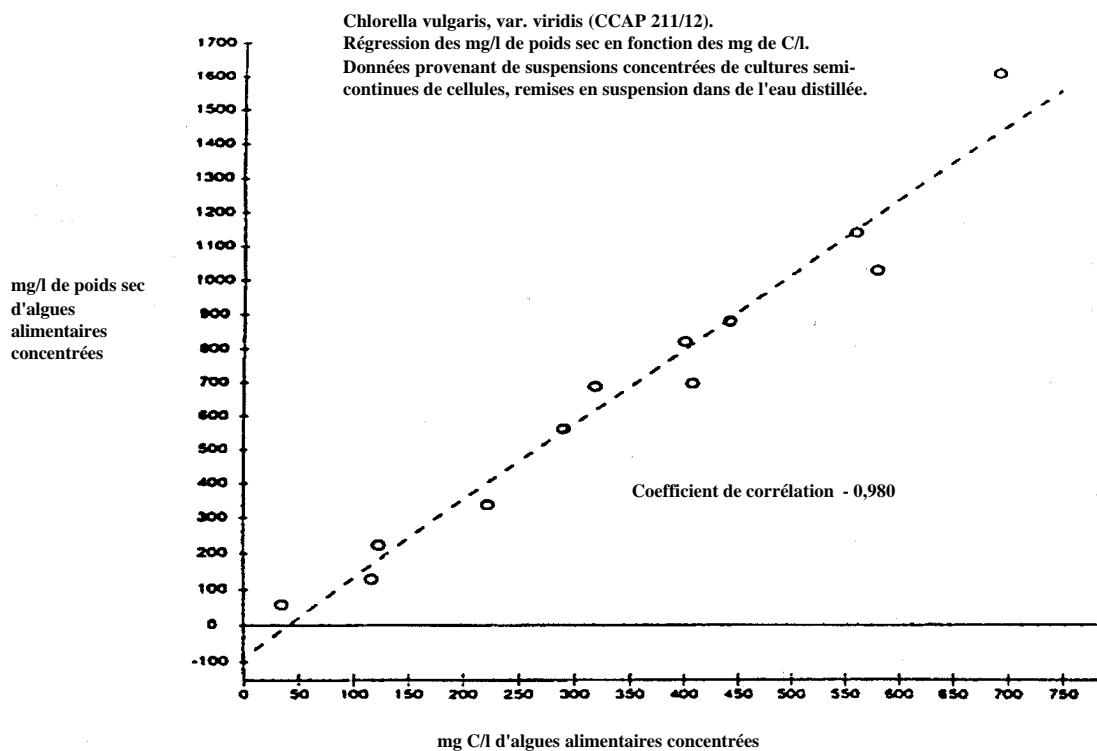
Il est admis que la teneur en carbone des algues alimentaires n'est généralement pas mesurée directement, mais déduite de corrélations (par nomogramme) avec des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière.

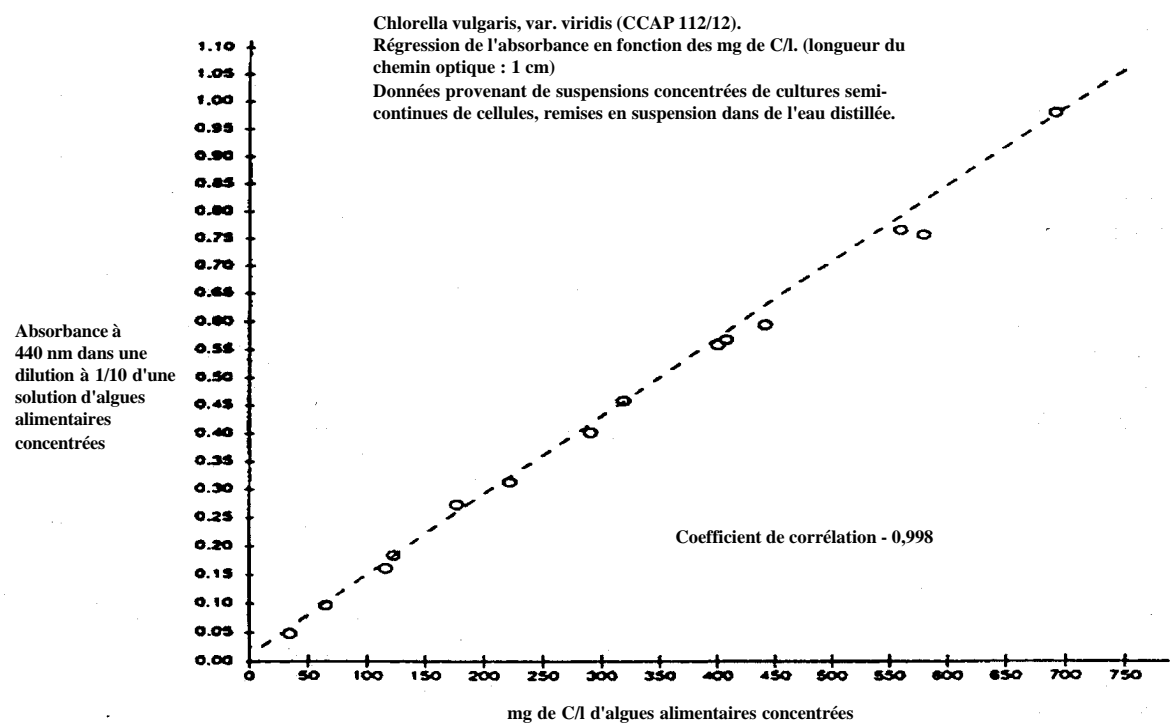
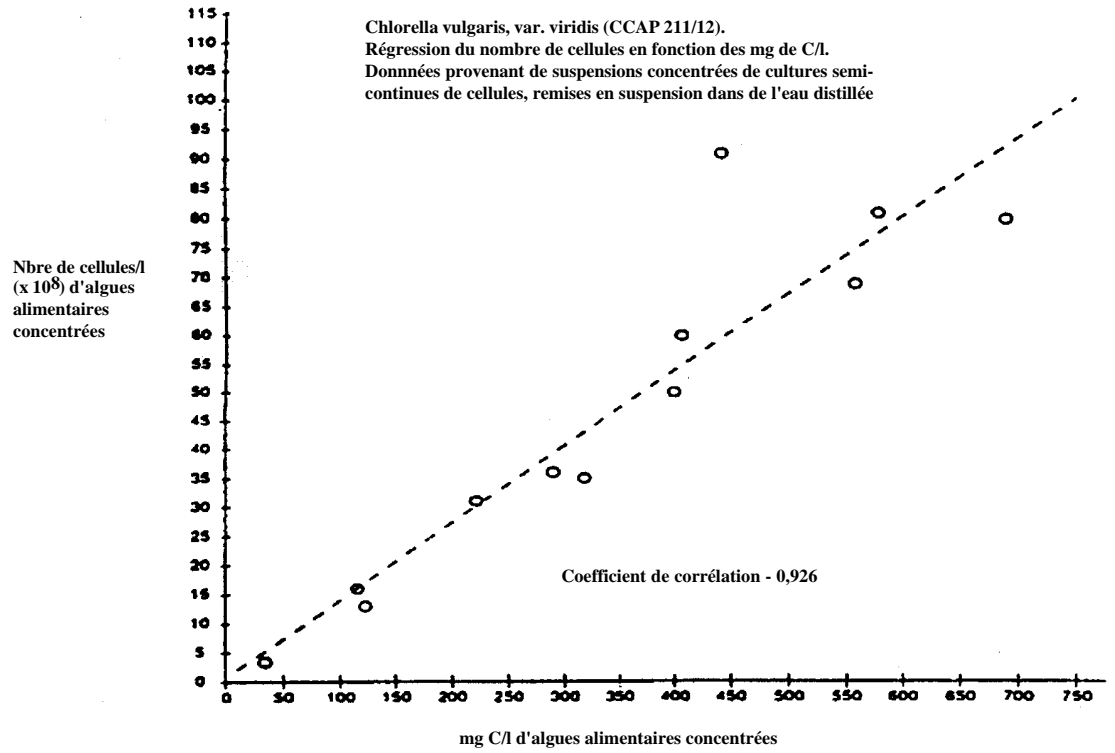
Il faudrait mesurer le COT par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes aux UV ou au persulfate. (voir : The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pour établir le nomogramme, il y a lieu d'isoler les algues du milieu de croissance par une centrifugation suivie d'une remise en suspension dans de l'eau distillée. On mesure le paramètre de remplacement et la teneur en COT dans chaque échantillon, produit en triple exemplaire. Les témoins contenant uniquement de l'eau distillée devraient être analysés et la teneur en COT déduite de celle de l'échantillon contenant les algues.

Les nomogrammes devraient être linéaires sur la plage prescrite des concentrations de carbone. Des exemples sont présentés ci-dessous.

**N.B. Ne pas utiliser pour les conversions; il est essentiel que les laboratoires établissent leurs propres nomogrammes.**





**ANNEXE 3**

**EXEMPLE DE FICHE POUR CONSIGNER LE RENOUVELLEMENT DU MILIEU, LES DONNÉES DE SURVEILLANCE PHYSICO-CHIMIQUES, L'ALIMENTATION, LA REPRODUCTION DES *DAPHNIA* ET LA MORTALITÉ DES ADULTES**

Expérience n<sup>o</sup>:      Date de départ :      Clone :      Milieu :      Type d'alimentation :      Substance d'essai :      Concentration nominale :

<b>Jour</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Renouvellement du milieu (cocher)																									
PH *																									Nouveau
																									Ancien
O <sub>2</sub> mg/l *																									Nouveau
																									Ancien
Température (°C) *																									Nouveau
																									Ancien
Alimentation fournie (cocher)																									
Nbre de descendants vivants **																									Total
Récipient 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Total
Mortalité cumulée des adultes ‡																									

\*Indiquer quel récipient a été utilisé pour l'expérience.

‡Indiquer la mortalité de tout animal adulte par la lettre "M" dans la case appropriée .

†Indiquer les portées avortées par les lettres "AB" dans la case appropriée.

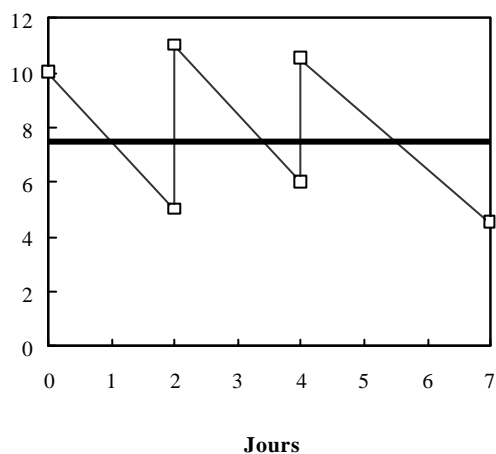


## ANNEXE 5

### CALCUL D'UNE MOYENNE PONDÉRÉE DANS LE TEMPS

#### **Moyenne pondérée dans le temps**

Étant donné que la concentration de la substance d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre deux renouvellements du milieu, il est nécessaire de rechercher la concentration qui devrait être considérée comme représentative de la plage des concentrations appliquées aux *Daphnia* parents. Le choix devrait être guidé par des considérations tant biologiques que statistiques. Si on estime, par exemple, que les effets sur la reproduction sont surtout sensibles à la concentration maximale, il faut utiliser la concentration maximale. Si, par contre, on juge que c'est l'effet cumulé ou à long terme de la substance toxique qui est prépondérant, il est plus pertinent d'utiliser une concentration moyenne. Dans ce cas, la concentration moyenne pondérée dans le temps convient, puisqu'elle tient compte de la variation de la concentration instantanée en fonction du temps.



**Figure 1 : Exemple de moyenne pondérée dans le temps**

La figure 1 représente un essai (simplifié), d'une durée de sept jours, avec renouvellement du milieu aux jours 0, 2, et 4.

- La ligne fine en zigzag représente la concentration en fonction du temps. La concentration est censée diminuer suivant un schéma de décroissance exponentielle.
- Les six points portés sur le graphique représentent les concentrations mesurées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.
- La ligne épaisse représente la moyenne pondérée dans le temps.

La moyenne pondérée dans le temps est calculée de façon que l'aire sous la moyenne pondérée dans le temps soit égale à l'aire sous la courbe de concentration. Le calcul correspondant à l'exemple ci-dessus est illustré dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Calcul de la moyenne pondérée dans le temps**

Renouvellement n°	Jours	Conc. 0	Conc. 1	Ln (Conc. 0)	Ln (Conc.1)	Aire
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Nombre total de jours : 7					Aire totale	50,091
					Moyenne PT	7,156

*Jours* correspond au nombre de jours de la période de renouvellement

*Conc. 0* est la concentration mesurée au début de chaque période de renouvellement

*Conc. 1* est la concentration mesurée à la fin de chaque période de renouvellement

*Ln (Conc.0)* est le logarithme népérien de Conc.0

*Ln (Conc.1)* est le logarithme népérien de Conc.1

*Aire* est l'aire sous la courbe exponentielle correspondant à chaque période de renouvellement. Elle se calcule par la formule suivante :

$$Aire = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times jours$$

La moyenne pondérée dans (*moyenne PT*) est l'*aire totale* divisée par le *nombre total de jours*.

Bien entendu, dans le cas de l'essai de reproduction chez *Daphnia*, le tableau devrait être complété jusqu'à 21 jours.

Il est clair que lorsque les observations ne sont faites qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que la baisse de concentration est effectivement exponentielle. Une courbe différente donnerait lieu à un calcul différent de l'aire. Cependant, une baisse de concentration exponentielle est plausible et constitue probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Il convient toutefois d'être prudent si l'analyse chimique ne détecte aucune substance à la fin de la période de renouvellement. À moins de pouvoir estimer la vitesse à laquelle la substance a disparu de la solution, il est impossible d'obtenir une aire sous la courbe réaliste et, partant, une moyenne pondérée dans le temps qui soit raisonnable.