

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

Proposition de revision de l'introduction aux lignes directrices de l'ocde pour les essais de produits chimiques, section 3

PARTIE 1 : PRINCIPES ET STRATEGIES APPLICABLES AUX ESSAIS DE DEGRADATION DE PRODUITS CHIMIQUES ORGANIQUES

DEGRADATION DE PRODUITS CHIMIQUES ORGANIQUES

1. GENERALITES

1. L'évaluation des dangers ou l'évaluation des risques peuvent s'appuyer sur des informations caractérisant la dégradabilité des produits chimiques organiques. L'évaluation des dangers ou des risques en général, et la classification des dangers pour le milieu aquatique en particulier, sont habituellement fondées sur des éléments issus d'essais normalisés de biodégradabilité facile, mais les résultats d'essais simulant la biodégradation dans l'eau, les sédiments aquatiques et le sol peuvent également servir ces objectifs. L'évaluation d'un danger ou d'un risque potentiel pour l'environnement peut également faire intervenir d'autres types de résultats d'essais tels que les essais de simulation des stations d'épuration des eaux usées (SEEU), de biodégradabilité intrinsèque, de biodégradabilité anaérobie, de biodégradabilité dans l'eau de mer et de transformation abiotique.

2. Afin d'évaluer le risque pour l'environnement engendré par des produits chimiques particuliers, il est nécessaire de disposer d'informations permettant d'estimer leurs concentrations probables dans le milieu. Ces estimations doivent être fondées en premier lieu sur la connaissance des modes d'utilisation et d'élimination probables du produit chimique, sur ses propriétés physico-chimiques et sur les caractéristiques du milieu récepteur.

3. La dégradation des produits chimiques organiques dans l'environnement influe sur l'exposition et constitue par conséquent un paramètre essentiel de l'estimation des risques d'effets indésirables à long terme sur le milieu biologique. Ce sont de préférence des essais de simulation de biodégradation mis en œuvre dans des conditions réalistes pour un compartiment particulier de l'environnement (par exemple SEEU, eau superficielle, sédiments ou sol) qui déterminent les vitesses de dégradation, ou demi-vies. L'objectif de ces essais est de reproduire des conditions environnementales réelles, telles que le potentiel redox, le pH, la température, les populations microbiennes, la concentration de la substance d'essai, ainsi que la présence et la concentration d'autres substrats.

4. Il s'agit là de facteurs importants qui déterminent, conjointement aux propriétés intrinsèques des produits chimiques, la dégradation des produits chimiques organiques dans l'environnement. Cette introduction a pour objet de décrire les principes des différents types d'essais de dégradation, et de proposer des orientations concernant l'interprétation et l'utilisation des données de dégradabilité.

2. BIODEGRADATION DANS L'EAU, LES SOLS ET LES SEDIMENTS**2.1 Introduction**

5. La démarche nécessaire d'acquisition des connaissances adaptée à la prise de décision en matière de protection de l'environnement doit permettre de maintenir le coût des essais aussi bas que possible, malgré la profusion de produits chimiques utilisés dans nos sociétés. Un système idéal permet un "screening" préliminaire des produits chimiques grâce à des essais relativement simples de biodégradabilité ultime et identifie des produits chimiques qui requièrent des études plus détaillées, et par conséquent plus coûteuses. Il est possible d'aborder l'étude de la biodégradabilité des produits chimiques en suivant une stratégie générale d'essais combinant des essais divers en termes de complexité, de réalisme environnemental et de coût :

- En premier lieu, la biodégradabilité aérobie est analysée par un essai de biodégradabilité facile
- Dans le cas d'un résultat négatif à l'essai de biodégradabilité facile, la biodégradation du produit chimique est étudiée dans un essai de simulation dont les résultats pourront être utilisés pour évaluer la vitesse de biodégradation dans l'environnement ou dans la station d'épuration biologique des eaux usées. Dans le cas d'un résultat positif à l'essai de biodégradabilité facile, mais lorsque des données plus précises sur la demi-vie de biodégradation ou TD_{50} sont nécessaires pour l'évaluation des risques, on procède de la même manière. Il est également possible de réaliser un essai de biodégradabilité intrinsèque en remplacement ou en complément de l'essai précédent afin d'obtenir des données décrivant la biodégradabilité potentielle dans des conditions aérobies optimisées, telles que celles susceptibles d'intervenir dans les SEEU après vieillissement prolongé des boues d'épuration
- De surcroît, la biodégradabilité potentielle en conditions anoxiques peut être étudiée par un essai de biodégradabilité anaérobie.

2.2 Définitions*Essais de biodégradabilité facile*

6. Il s'agit d'essais de "screening" rigoureux, effectués en conditions aérobies, dans lesquels la substance d'essai est utilisée à concentration élevée (dans l'intervalle de 2 à 100 mg/l) et la biodégradation est mesurée par des paramètres non spécifiques tels que la disparition du carbone organique dissous (COD), la demande biochimique en oxygène (DBO) et la production de CO_2 . Les eaux usées domestiques, les boues activées ou les effluents secondaires constituent les sources habituelles de micro-organismes (inoculum) dans les essais de biodégradabilité facile. L'inoculum ne doit pas avoir subi d'adaptation préalable à la dégradation de la substance d'essai par une exposition initiale à celle-ci ou à des produits chimiques de structure similaire. Un résultat positif dans un essai de biodégradabilité facile peut être considéré comme un indicateur d'une dégradation rapide et ultime¹ dans la plupart des environnements, y compris les stations d'épuration biologique des eaux usées.

7. Un produit chimique qui atteint le niveau seuil dans ces essais à une certaine vitesse après la fin de la phase de latence peut être classé comme "facilement biodégradable". Le niveau seuil dépend du paramètre analytique mesuré.

¹ La dégradation ultime est la dégradation d'une substance en CO_2 , biomasse, H_2O et autres substances inorganiques telles que le NH_3 .

Essais de simulation

8. Il s'agit d'essais en conditions aérobies et anaérobies qui fournissent des informations sur la biodégradation dans des conditions environnementales appropriées bien déterminées. Ces essais simulent la dégradation dans un environnement spécifique par le biais de l'utilisation d'une biomasse indigène, de différents milieux, de solides appropriés (par exemple, sols, sédiments, boues activées ou autres surfaces) permettant la sorption du produit chimique, et à une température précise représentative de l'environnement particulier. Dans ces essais, la substance d'essai est utilisée à faible concentration lorsqu'on cherche à déterminer la constante de vitesse de biodégradation, et à des concentrations plus élevées quand l'objectif est d'identifier et de quantifier les principaux produits de transformation pour des raisons analytiques.

9. Dans ces types d'essais, une faible concentration de produit chimique correspond à une concentration qui est suffisamment basse (par exemple de moins de 1 µg/l à 100 µg/l) pour garantir la reproduction par la cinétique de biodégradation obtenue dans l'essai de celle attendue dans l'environnement simulé. La mesure de la biodégradation est fondée sur des techniques de marquage par un isotope radioactif ou par des analyses chimiques spécifiques. Les essais de ce genre peuvent être subdivisés en fonction du milieu qu'ils cherchent à simuler, par exemple : a) sol, b) sédiments aquatiques, c) eau superficielle et d) station d'épuration des eaux usées.

Essais de biodégradabilité intrinsèque

10. Il s'agit d'essais à haut pouvoir de dégradation, et dans lesquels on mesure la vitesse ou l'ampleur de la biodégradation en milieu aérobie. Leurs protocoles autorisent une exposition prolongée de micro-organismes à la substance testée, et emploient un rapport substance testée/biomasse peu élevé, ce qui augmente les probabilités d'obtention d'un résultat positif par rapport aux essais de biodégradabilité facile. Certains d'entre eux font parfois appel à des micro-organismes ayant été préalablement exposés à la substance d'essai, une étape qui favorise généralement une adaptation susceptible d'augmenter significativement la vitesse de dégradation.

11. Un composé donnant un résultat positif dans un essai de ce type peut être classé comme "intrinsèquement biodégradable", qualificatif qui sera de préférence précisé par l'un des termes "avec préadaptation" ou "sans préadaptation" selon le cas. En raison des conditions favorables employées dans ces essais, il n'est en général pas possible de tabler sur une biodégradation rapide dans l'environnement des produits chimiques intrinsèquement biodégradables.

Essai de « screening » de biodégradabilité anaérobie

12. Les essais de "screening" sont effectués dans des conditions anoxiques, avec une concentration élevée du composé étudié (mg/l) et la biodégradation est mesurée par des paramètres non spécifiques tels que la production de carbone inorganique total (CIT), de CO₂ et de CH₄. Ces essais sont utilisés pour évaluer la biodégradabilité anaérobie potentielle dans un digesteur anaérobie pour un intervalle défini de concentrations de micro-organismes.

2.3 Essais de biodégradabilité facile

13. De par leur conception, les essais de biodégradabilité facile doivent produire des résultats positifs non équivoques. Une fois un résultat positif obtenu dans un essai de biodégradabilité facile, on peut supposer que le produit chimique subira une biodégradation rapide et complète dans l'environnement. Il est alors normalement inutile de procéder à de nouvelles études de la biodégradabilité du composé ou des effets éventuels sur l'environnement de ses produits de transformation. Toutefois, la classification du produit chimique comme "facilement biodégradable" n'exclut pas les problèmes de constantes de vitesses de biodégradation et de produits de transformation dans les cas de déversements en grandes quantités dans

un milieu récepteur. En effet, les essais de biodégradabilité facile peuvent parfois échouer en raison de la rigueur des conditions de l'essai, aussi des résultats d'essais régulièrement positifs devront-ils prévaloir sur des résultats d'essais négatifs. Toutefois, en cas de résultats contradictoires, il est recommandé de contrôler l'origine de l'inoculum afin de vérifier l'existence éventuelle de différences d'adaptation de l'inoculum qui pourraient expliquer ces divergences.

14. Lorsque le risque d'effets indésirables ne peut être exclu, comme dans le cas de certaines substances chimiques produites en grandes quantités, il est recommandé de déterminer la vitesse de biodégradation de la substance de départ par un essai de simulation adapté. Le cas échéant, une évaluation des risques incluant la substance initiale et d'éventuels produits de transformation majeurs peut être effectuée.

15. Un résultat négatif dans un essai de biodégradabilité facile n'implique pas nécessairement que le produit chimique ne sera pas dégradé dans des conditions environnementales réelles, mais indique qu'il faut envisager de passer au niveau suivant d'essai, c'est-à-dire un essai de simulation ou un essai de biodégradabilité intrinsèque.

16. Les essais de l'OCDE susceptibles d'être utilisés pour déterminer la biodégradabilité facile de produits chimiques organiques comprennent les six méthodes d'essai décrites dans les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais 301 A-F : essai de disparition du COD (301 A), essai de dégagement de CO₂ (301 B), essai MITI modifié (I) (301 C), essai en flacon fermé (301 D), essai de "screening" modifié de l'OCDE (301 E) et essai de respirométrie manométrique (301 F). Les niveaux seuils de biodégradation suivants, obtenus en 28 jours, peuvent être considérés comme des preuves de biodégradabilité facile : diminution de 70 % du COD (301 A et 301 E) ; production de 60 % de dioxyde de carbone théorique (CO₂Th) (301 B) ; consommation de 60 % de la demande théorique en oxygène (DThO) (301 C, 301 D et 301 F). L'éventualité d'une diminution du niveau seuil de l'essai respirométrique de 60% à 50% (ligne directrice 301) a été évoquée par les laboratoires sous contrat et dans la littérature. Toutefois, cette modification n'a pas encore été mise en place.

17. Ces niveaux seuils doivent être atteints dans un intervalle de temps de 10 jours compris à l'intérieur de la période de 28 jours de l'essai. L'intervalle de 10 jours ne s'applique pas à l'essai 301 C. Il débute lorsque le taux de biodégradation atteint 10 % du COD, de la DThO ou du CO₂Th et doit se terminer avant le 28^{ème} jour de l'essai. Les niveaux seuils de 60 % de la DThO (ou du CO₂Th) ou de 70 % de diminution du COD représentent une dégradation ultime pratiquement complète de la substance testée car on suppose que la fraction restante de 30-40 % est assimilée par la biomasse ou présente sous forme de produits de biosynthèse.

18. Un autre essai de biodégradabilité facile, qui peut remplacer l'essai de dégagement de CO₂ (301 B), est l'essai dans l'espace de tête (Essai de biodégradabilité facile - CO₂ en récipients hermétiquement clos ; 310). Dans cet essai est mesuré le dégagement de CO₂ dû à la biodégradation aérobie ultime du composé testé par mesure du carbone inorganique (CI) produit dans des flacons hermétiquement clos, et le niveau de seuil a été défini à 60 % de la production de CI maximale théorique (CITh).

19. Toutes les méthodes mentionnées ci-dessus concernent l'eau douce, mais des protocoles d'essai dans l'environnement marin ont également été décrits : l'essai 306 de l'OCDE sur la biodégradabilité dans l'eau de mer comprend des variantes dans l'eau de mer de l'essai en flacon fermé (301 D) et de l'essai de "screening" modifié de l'OCDE (301 E). La dégradation de produits chimiques organiques dans l'eau de mer se révèle généralement plus lente que dans l'eau douce, les boues activées et les effluents d'eaux usées, et c'est pourquoi un résultat positif de biodégradabilité obtenu en 28 jours (méthode en flacon fermé) ou en 60 jours (méthode en flacon agité) dans l'essai en eau de mer peut être considéré comme une preuve du

potentiel de biodégradation du produit chimique dans l'environnement marin. Par exemple, un résultat supérieur à 20 % de la DThO ou d'élimination du COD indique un potentiel de biodégradation primaire dans l'environnement marin, et un résultat supérieur à 60 % de DThO ou à 70 % d'élimination du COD détermine un potentiel de dégradation ultime dans l'environnement marin.

20. Les lignes directrices pour les essais mentionnées ci-dessus ont plusieurs aspects en commun. Dans tous les essais, la substance étudiée, qui constitue l'unique source de carbone organique (en dehors du carbone associé à la biomasse), est diluée dans un milieu d'essai contenant une concentration relativement faible de biomasse. Dans tous les essais, le déroulement de la biodégradation est suivi par une méthode analytique non spécifique, avec pour avantage la possibilité d'appliquer les méthodes à des substances organiques très diverses et de s'affranchir de l'obligation de développer des protocoles analytiques spécifiques. Ces méthodes s'adaptant également à tous les résidus de biodégradation ou produits de transformation, elles fournissent une indication du degré de biodégradation ultime.

21. La durée normalisée de l'essai est de 28 jours, mais elle peut être prolongée au-delà si la biodégradation a commencé mais n'a pas encore atteint un plateau. Cependant, seul le degré de biodégradation atteint en 28 jours devra être utilisé pour évaluer la biodégradabilité facile, la dégradation postérieure à 28 jours permettant de classer la substance d'essai comme "intrinsèquement biodégradable" (voir le paragraphe 36).

22. Il est admis que la normalisation de l'inoculum peut également améliorer la comparabilité des méthodes. Toutefois, cette démarche est impossible sans réduction significative simultanée du nombre d'espèces présentes dans le système d'essai. Il est donc recommandé d'utiliser un inoculum mixte pour garantir la diversité des organismes responsables de la dégradation dans les essais. Après considération de la rigueur exigée dans ces protocoles, il a également été décidé d'interdire l'exposition préalable (c'est-à-dire la préadaptation) de l'inoculum à la substance d'essai. Un essai dans lequel on utilise un inoculum pré-exposé n'est plus par définition un essai de biodégradabilité facile et un résultat positif peut alors être utilisé pour classer le composé testé dans la catégorie "intrinsèquement biodégradable avec préadaptation" (voir le paragraphe 11). Une étude de comparaison inter-laboratoires de l'OCDE (essai circulaire) (1) a été réalisée en 1988 dans le but de s'assurer de la faisabilité et de la validité des essais.

2.4 Essais de simulation

23. L'objectif des essais de simulation est d'évaluer la vitesse et le degré de biodégradation dans un système de laboratoire conçu pour reproduire l'étape de traitement aérobique des stations d'épuration ou de compartiments particuliers de l'environnement, comme l'eau douce ou l'eau de mer superficielles.

Traitement des eaux usées

24. Il est possible d'étudier en laboratoire le devenir des produits chimiques dans les stations d'épuration en utilisant l'Essai de simulation - Traitement aérobique des eaux usées : unités de traitement par boues (303 A) et biofilms (303 B). L'élimination de la substance d'essai est déterminée en suivant les variations de COD et/ou de demande chimique en oxygène (DCO). Les protocoles d'essai de base (303 A et 303 B) recommandent l'addition de la substance d'essai à une concentration de COD comprise entre 10 mg/l et 20 mg/l. Toutefois, de nombreux produits chimiques sont habituellement présents à de très faibles concentrations, même dans les eaux usées, et des protocoles d'essais de biodégradation à faibles concentrations (<100 µg/l) sont présentés dans l'annexe 7 de la Ligne directrice 303 A.

25. Aucun seuil spécifique n'a encore été défini pour l'élimination des produits chimiques dans les essais de simulation de traitement des eaux usées en conditions aérobies. Il convient de noter qu'un tel seuil doit être adapté aux conditions spécifiques de fonctionnement et au type d'installation. Les résultats des

essais peuvent être utilisés pour estimer l'élimination dans les SEEU et les concentrations d'effluents produits pour prédire la concentration dans la station d'épuration et dans le milieu aquatique récepteur.

26. La cinétique de Monod² (proposée à l'origine uniquement pour les cultures pures et les systèmes à un seul substrat) peut être utilisée pour décrire la dégradation d'une substance lorsque l'on suppose que la croissance est un processus continu et que la biomasse est produite pendant l'utilisation de la substance d'essai. D'après la cinétique de Monod, la concentration à la sortie est indépendante de la concentration à l'entrée, bien que cela ne soit plus vrai lorsque la substance d'essai sert de substrat secondaire pour la biomasse de dégradation. La présence de la substance d'essai comme substrat secondaire correspond à un scénario à faible concentration, et la vitesse de dégradation peut alors être exprimée par une cinétique de pseudo-premier ordre³ ou de premier ordre⁴ (2)(3).

Sol, sédiments et eau

27. Les essais suivants peuvent être utilisés pour simuler la biodégradation de produits chimiques organiques, dans des conditions environnementales réalistes, dans le sol, les sédiments, ou les eaux superficielles : transformation aérobie et anaérobie dans le sol (307) ; transformation aérobie et anaérobie dans les sédiments aquatiques (308) ; et minéralisation aérobie dans les eaux superficielles – essai de simulation de la biodégradation (309).

28. Les sols aérés sont aérobies, tandis que les sols saturés en eau ou gorgés d'eau sont le plus souvent en conditions essentiellement anaérobies. La couche superficielle des sédiments aquatiques peut être aérobie ou anaérobie, tandis que les couches plus profondes sont ordinairement anaérobies. Ces conditions dans le sol ou les sédiments peuvent être simulées en utilisant les essais aérobies ou anaérobies décrits dans les lignes directrices pour les essais (307 et 308).

29. On utilise habituellement, dans les essais conçus pour déterminer la biodégradation, une faible concentration du composé testé qui correspond à une concentration suffisamment basse (par exemple de 1 µg/l à 100 µg/l dans la Ligne directrice 309) pour garantir une bonne correspondance de la cinétique de biodégradation (du premier ordre ou du pseudo-premier ordre) mesurée dans l'essai avec celle supposée s'appliquer dans l'environnement.

30. Il faut tenir compte de la dépendance des constantes cinétiques vis à vis des températures. Il est recommandé de conduire l'essai à une température caractéristique de l'environnement qu'il simule.

31. Dans le cas de produits chimiques marqués par des isotopes radioactifs, le marqueur doit se situer dans la partie la plus récalcitrante de la molécule lorsqu'on évalue une minéralisation totale. Si la structure la plus stable ne comprend pas la partie fonctionnelle ou d'intérêt environnemental de la molécule, l'utilisation d'un produit chimique à tester doté d'un marquage différent peut être préférable.

² La vitesse de dégradation de la substance de l'essai dans une étude de laboratoire lorsque la substance est la seule source de carbone et d'énergie, peut être décrite par : $-dS/dt = [(\mu_{\max}/Y) \cdot B \cdot S] / [K_s + S]$; où : $-dS/dt$ représente la vitesse de dégradation, μ_{\max} la vitesse de croissance maximale, Y le coefficient de rendement, B la concentration de la biomasse, K_s la constante de demi-saturation, et S la concentration de la substance d'essai.

³ La vitesse de dégradation est proportionnelle aux concentrations de la substance d'essai et de la biomasse, c'est-à-dire : $-dS/dt = k_1 \cdot S \cdot B$; où k_1 représente la constante de vitesse de premier ordre. On suppose que la concentration de la biomasse (B) est constante pendant l'expérience.

⁴ La cinétique de premier ordre, c'est-à-dire $-dS/dt = k_1 \cdot S$, peut être utilisée lorsque la dégradation de la substance d'essai est indépendante de la concentration de biomasse.

32. La mesure de la disparition du composé de départ par analyse chimique n'implique pas nécessairement sa minéralisation. Les essais de simulation sont particulièrement utiles lorsque des essais précédents ont montré que la substance d'essai pouvait être minéralisée et que la dégradation mesurée englobe le processus qui détermine la vitesse.

33. Les essais de simulation peuvent donner les résultats suivants :

- Constante de vitesse du premier ordre ou du pseudo-premier ordre ;
- Demi-vie de dégradation⁵ ou TD₅₀⁶ ;
- Constante de demi-saturation ;
- Vitesse de croissance spécifique maximale ;
- Fraction de marqueur minéralisée et, lorsque des analyses spécifiques sont utilisées, niveau final de dégradation primaire ;
- Bilan massique pendant et à la fin de l'étude ;
- Identification et concentration des principaux produits de transformation, le cas échéant ;
- Voie de transformation proposée, le cas échéant.

On trouvera une description complète des paramètres de résultat relatifs aux lignes directrices des essais de simulation de dégradation dans le texte de ces lignes directrices (303, 304, 307, 308 et 309).

2.5 Essais de biodégradabilité intrinsèque

34. Les essais de biodégradabilité intrinsèque ont été conçus pour évaluer, dans des conditions favorables, le potentiel éventuel de biodégradation du produit chimique sous conditions aérobies. Les essais de biodégradabilité intrinsèque permettent de mesurer des capacités de dégradation différentes (voir paragraphe 35) et les différences entre les conditions d'essai doivent être prises en considération lorsque les résultats sont utilisés pour indiquer une biodégradation ou une persistance potentielles dans l'environnement. La biodégradabilité intrinsèque peut être mesurée par une analyse spécifique (biodégradation primaire) ou non spécifique (biodégradation ultime).

35. Les essais susceptibles d'être utilisés pour déterminer la biodégradabilité intrinsèque des produits chimiques organiques comprennent les trois méthodes décrites dans les lignes directrices de l'OCDE pour les essais 302 A-C : essai de SCAS modifié (302 A), essai Zahn-Wellens/EMPA (302 B) et essai MITI modifié (II) (302 C). La capacité de biodégradation mesurée par ces essais s'accroît dans l'ordre 302 C < 302 B < 302 A.

36. La biodégradabilité intrinsèque pouvant être considérée comme une propriété spécifique d'un produit chimique, il n'est pas nécessaire de définir des limites de durée de l'essai ou de vitesse de biodégradation. Une biodégradation supérieure à 20 % de la valeur théorique (mesurée en DBO, élimination du COD, ou DCO) peut être considérée comme démontrant une biodégradabilité primaire intrinsèque, et une biodégradation supérieure à 70 % de la valeur théorique (mesurée en DBO, élimination du COD ou DCO) comme la preuve d'une biodégradabilité ultime intrinsèque. Lorsque les résultats des essais de biodégradabilité facile montrent que le critère des niveaux de seuil est presque satisfait (c'est-à-dire que la DThO ou le COD sont légèrement inférieurs à 60 % ou 70 %, respectivement), ils peuvent être utilisés pour indiquer une biodégradabilité intrinsèque. Il en va de même lorsque le critère des niveaux de

⁵ La demi-vie [$t_{0,5}$ (d)] est caractéristique de la vitesse d'une réaction de premier ordre et correspond à l'intervalle de temps nécessaire pour que la concentration soit divisée par deux.

⁶ Le TD₅₀ (Temps de disparition 50) est le temps nécessaire pour que la concentration de la substance d'essai diminue de 50 % ; il diffère de la demi-vie $t_{0,5}$ lorsque la transformation n'est pas régie par une cinétique de premier ordre.

seuil est satisfait, mais non celui de l'intervalle de 10 jours. Ces applications particulières des essais de biodégradabilité facile, avec, par exemple, une incubation supérieure à 28 jours, permettent parfois de s'affranchir de l'obligation de procéder à des essais supplémentaires de biodégradabilité intrinsèque ou de simulation.

37. Lorsque les résultats indiquent la possibilité d'une biodégradabilité ultime intrinsèque, ils signalent un potentiel de dégradation en conditions favorables pour la substance, par exemple, dans une station d'épuration fonctionnant efficacement. Lorsque le résultat d'un essai de biodégradabilité intrinsèque est négatif, une conclusion préliminaire de persistance dans l'environnement peut être tirée, et inciter à l'évaluation d'effets indésirables potentiels des produits de transformation. L'étude de la biodégradation ultime du produit chimique à des concentrations basses, réalistes du point de vue de l'environnement dans un essai de simulation, est une autre possibilité.

2.6 Essais de "screening" de biodégradabilité anaérobie

38. La biodégradabilité anaérobie potentielle de produits chimiques organiques peut être déterminée en utilisant l'essai de biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans des boues digérées/par mesure de la production de gaz (Ligne directrice 311, en projet). La substance d'essai, qui est l'unique source de carbone organique ajouté dans l'essai, est exposée à une boue digérée en conditions anaérobies diluée à concentration relativement faible. La biodégradabilité de la substance d'essai est suivie par des mesures de l'augmentation de la pression dans l'espace de tête résultant du dégagement de CO₂, de CH₄ et de CIT.

39. Une durée d'essai de 60 jours est recommandée, mais l'expérience peut être prolongée au-delà ou interrompue plus tôt si la biodégradation atteint un plateau, indice d'un degré de biodégradation suffisant (> 60 % de la production théorique de gaz). Aucune décision formelle n'a encore été prise concernant les critères de biodégradabilité anaérobie, mais la valeur la plus faible (60 %) pour la biodégradabilité aérobie facile (60 % de la DThO ou 60 % du CO₂Th) a été adoptée à titre provisoire.

40. Le projet de Ligne directrice 311 a pour but d'évaluer la biodégradabilité anaérobie ultime des produits chimiques organiques dans les digesteurs chauffés destinés au traitement des boues sous conditions anaérobies. Cet essai n'est donc pas nécessairement applicable aux compartiments anoxiques de l'environnement tels que les sédiments et les sols anoxiques.

2.7 Interprétation des résultats

Essais de biodégradabilité facile

41. Pour interpréter les résultats d'un essai, il convient de considérer la courbe de biodégradation dans sa totalité afin de pouvoir identifier la durée de la phase de latence, la pente et le niveau du plateau. La durée de 28 jours dans les essais de biodégradabilité facile a été définie afin de laisser le temps aux micro-organismes de s'adapter à la substance d'essai (phase de latence), ce qui se traduit par une augmentation du nombre de micro-organismes actifs responsables d'une dégradation détectable.

42. Même si la durée d'essai de 28 jours autorise un temps d'adaptation, les produits chimiques qui se dégradent lentement après une courte phase de latence ne seront pas considérés comme facilement biodégradables dans les essais employant l'intervalle de 10 jours lorsque la vitesse est trop lente pour que le processus respecte le critère d'intervalle de 10 jours, ou un critère de vitesse équivalent. Par conséquent, il est nécessaire que le niveau seuil de biodégradabilité facile soit atteint en 10 jours à partir du début de la biodégradation (intervalle de 10 jours). On considérera que la biodégradation a commencé dès qu'elle dépasse la barre des 10 %.

43. Ces essais sont conçus pour évaluer des produits chimiques purs, mais il est parfois intéressant d'étudier la biodégradabilité facile de mélanges de produits chimiques de structures similaires, tels que des huiles et des substances tensioactives (agents de surface). Ces composés se retrouvent souvent sous forme de mélanges de composants qui diffèrent par leurs longueurs de chaînes, les degrés et/ou les sites de ramification ou leurs stéréo-isomères, même sous leurs formes commerciales les plus purifiées. Il peut être coûteux, voire impossible de procéder à l'essai de chaque composant individuel. En réalisant un essai sur le mélange et en supposant que les structures individuelles subissent des biodégradations successives, le critère d'intervalle de 10 jours ne pourra s'appliquer pour interpréter les résultats de l'essai. Il faudra cependant procéder à une évaluation au cas par cas pour déterminer si un essai de biodégradabilité sur un tel mélange complexe permet d'obtenir des informations exploitables en terme de biodégradabilité du mélange tel quel (c'est-à-dire de dégradabilité de tous les constituants) ou s'il est nécessaire d'étudier la dégradabilité de composants individuels soigneusement sélectionnés dans le mélange.

44. Il convient de noter que ces mélanges sont considérés ici comme des matériaux techniques de produits chimiques de types similaires (par exemple, homologues d'agents tensioactifs composés d'alcools gras de longueurs de chaîne variables ou matériaux de poly(oxyalkylène) polyol ayant des distributions de masses moléculaires définies). Les essais de biodégradabilité facile ne sont généralement pas applicables à des mélanges complexes contenant des produits chimiques de types différents.

45. Les résultats d'un essai de biodégradabilité facile peuvent être utilisés pour classer les produits chimiques du point de vue des dangers pour l'environnement aquatique. Selon les principes énoncés dans le Système de classification harmonisé et intégré des dangers pour la santé humaine et l'environnement des substances et mélanges chimiques (4), on peut considérer un résultat positif dans l'un des essais de biodégradabilité facile de l'OCDE comme un indicateur d'une dégradation rapide dans la plupart des environnements. Des résultats positifs à l'essai TG 306, qui convient surtout aux milieux marins, peuvent également être considérés comme des preuves de dégradabilité rapide.

46. Les résultats d'essais de biodégradabilité facile peuvent être utilisés pour évaluer la biodégradation dans un compartiment spécifique de l'environnement, quand aucun autre résultat issu d'essais simulant les conditions dans ce compartiment n'est disponible (5)(6). La dérivation de constantes de vitesse du premier ordre dans le but de modéliser la biodégradation dans les stations d'épuration, les eaux superficielles, les sédiments et les sols, est alors possible en appliquant des principes pragmatiques. (voir exemples aux paragraphes 47 et 48).

47. Par exemple, le document d'orientation technique de la Commission européenne sur l'évaluation des risques (5) préconise l'attribution d'une constante de vitesse (k) de 1.0 heure^{-1} , et d'une demi-vie de 0.69 heure aux produits chimiques facilement biodégradables (qui remplissent les conditions de niveau de seuil et d'intervalle de 10 jours) dans les modèles d'estimation de l'élimination des produits chimiques dans les SEEU (modèles de SEEU). Il est possible d'utiliser une constante de vitesse plus faible de $0,3 \text{ heure}^{-1}$, équivalente à une demi-vie de 2.3 heures, dans les modèles de SEEU lorsqu'un produit chimique atteint le niveau seuil au cours de la période de 28 jours, mais ne répond pas au critère de l'intervalle de 10 jours (5).

48. Le même objectif est considéré dans un document d'orientation de l'Agence pour la protection de l'environnement des États Unis, qui décrit l'utilisation de données de biodégradabilité dans des modèles multimilieux et des modèles de SEEU (6). Ce document explique comment utiliser des résultats d'essais de biodégradabilité facile pour calculer des demi-vies de boues activées comme il est indiqué ci-dessous :

- Produits chimiques facilement biodégradables : 1 heure ($k = 0.69 \text{ heure}^{-1}$) ;
- Produits chimiques atteignant une dégradation $\geq 40\%$: 3 heures ($k = 0.23 \text{ heure}^{-1}$) ;
- Produits chimiques atteignant une dégradation ≥ 20 mais $< 40\%$: 10 heures ($k = 0.069 \text{ heure}^{-1}$).

49. Lorsque la biodégradabilité du produit chimique n'atteint pas le niveau de seuil, il est recommandé de vérifier s'il est inhibiteur vis-à-vis de l'activité microbienne à la concentration utilisée dans l'essai. Si c'est le cas, il peut être à nouveau analysé à des concentrations non inhibitrices plus faibles par un essai de simulation adéquat (Lignes directrices 303, 307, 308 ou 309). Il est généralement déconseillé de procéder à un nouvel essai de biodégradabilité facile modifié à une concentration beaucoup plus basse (par exemple divisée par 10 par rapport à la concentration prescrite), lorsque des méthodes d'essais de simulation appropriées sont disponibles (4)(5).

Essais de simulation

50. Un produit chimique qui ne répond pas aux critères de biodégradabilité facile, ou même aux critères de biodégradabilité intrinsèque, peut cependant être rapidement dégradé lorsqu'il est présent à faibles concentrations dans l'environnement. Des essais de simulation peuvent permettre d'étudier la biodégradation des produits chimiques organiques dans les SEEU (303 A et 303 B), le sol (307), les sédiments aquatiques (308) et l'eau superficielle (309). S'il est démontré que le produit chimique subit une dégradation ultime supérieure à 70 % en 28 jours dans des conditions réalistes dans le milieu aquatique (par exemple en utilisant les Lignes directrices 308 et 309) la définition de "dégradabilité rapide" relative à la classification des dangers pour le milieu aquatique est adéquate (4).

51. Les résultats d'un essai de simulation révèlent parfois une transformation rapide du composé originel, alors que la dégradation ultime, mesurée par exemple par la production de CO₂ gazeux, est limitée par la formation de produits de transformation récalcitrants. Il est alors nécessaire de distinguer la biodégradation primaire de la biodégradation ultime lors du calcul de la vitesse et du degré de dégradation.

52. Dans l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre, raisonnable aux faibles concentrations de substances prévalant dans la plupart des environnements aquatiques, la condition de "dégradabilité rapide" relative à la classification de dangers pour l'environnement aquatique est remplie lorsqu'un produit chimique atteint une biodégradation ultime dans un essai de simulation avec une demi-vie inférieure à 16 jours (4). Il est possible d'utiliser directement les résultats des essais de stimulation en milieu aquatique (Lignes directrices 308, 309, par exemple) à des fins de classification des dangers pour l'environnement aquatique lorsque des conditions environnementales réalistes sont simulées, c'est-à-dire si :

- La concentration de substances est réaliste pour l'environnement aquatique général (le plus souvent de l'ordre du µg/l ou du µg/kg) ;
- L'inoculum provient d'un environnement aquatique adéquat ;
- La concentration d'inoculum est réaliste (par exemple 10³-10⁶ cellules/ml dans l'eau superficielle) ;
- La température est réaliste (par exemple 5 °C à 25 °C) ;
- La dégradation ultime est déterminée (c'est-à-dire que la vitesse de minéralisation ou les vitesses de dégradation individuelles pour tous les produits de transformation pertinents sont déterminées).

53. S'il n'existe aucune donnée disponible issue d'essais de simulation ou de screening en milieu aquatique, il est possible d'estimer la vitesse de dégradation d'un produit chimique dans une eau superficielle grâce aux résultats d'un essai de simulation de dégradation dans un sol (Ligne directrice 307, par exemple). En terme de classification des dangers pour l'environnement aquatique, un produit chimique peut être considéré comme rapidement dégradable dans l'environnement aquatique si sa dégradation ultime dans le sol se caractérise par une demi-vie inférieure à 16 jours, sous réserve qu'aucune exposition préalable n'ait été effectuée et que la concentration du produit chimique utilisée soit réaliste (voir référence 4, annexe 2, chapitre 4). En termes d'évaluation des risques, des approches similaires ont été proposées pour l'extrapolation des résultats issus d'essais de biodégradation afin de calculer des constantes de vitesse dans l'eau superficielle, les sédiments et le sol (5).

54. Autant que possible, l'évaluation de la biodégradation dans l'environnement sera fondée sur des résultats d'essais simulant les conditions dans le compartiment adéquat de l'environnement. La demi-vie et les constantes de cinétique de dégradation déterminées par un essai de simulation devront être corrigées pour tenir compte de la température extérieure moyenne, à moins de démontrer que la différence entre la température de l'essai et la température extérieure est négligeable.

55. Il convient de noter que les résultats d'un essai de simulation ne pourront être extrapolés à la dégradation dans l'environnement réel que si les concentrations utilisées dans l'essai sont du même ordre de grandeur que les concentrations prévues dans l'environnement.

56. Les produits chimiques organiques artificiels sont normalement présents dans l'environnement en faibles concentrations (c'est-à-dire de l'ordre du $\mu\text{g/l}$) par rapport à la masse totale des substrats carbonés biodégradables. Les cinétiques de biodégradation anticipées sont par conséquent de premier ordre (cinétique "sans croissance"). Lorsque la concentration utilisée dans un essai est plus élevée (par exemple, dans le but d'étudier les produits de transformation), la biodégradation du produit chimique favorisera souvent la croissance des micro-organismes responsables de la dégradation.

57. Il arrive souvent que les cinétiques de dégradation dans le sol ou les sédiments s'écartent de la cinétique de premier ordre en raison des processus de sorption/désorption qui se mettent en place parallèlement aux processus de dégradation. Il est alors du ressort des experts d'estimer la ou les demi-vies de dégradation des divers sous-compartiments (7).

58. Lorsqu'on dispose des résultats de plusieurs essais de simulation, il est préférable d'utiliser une valeur appropriée de la demi-vie ou du TD_{50} située à l'extrémité supérieure de l'intervalle observé pour estimer la dégradation dans l'environnement, en tenant compte du réalisme, de la pertinence, de la qualité et de la documentation des études relativement aux conditions environnementales (5).

Biodégradabilité intrinsèque

59. Les essais de biodégradabilité intrinsèque sont utilisés pour évaluer l'éventuel potentiel de biodégradation d'un produit chimique. Le document d'orientation technique de la Commission européenne (5) propose l'utilisation des résultats de l'essai Zahn-Wellens/EMPA (302 B) et de l'essai MITI modifié (II) (302 C) pour extrapoler une constante de vitesse dans des modèles d'estimation de l'élimination des produits chimiques dans les stations d'épuration (5). Toutefois, cette extrapolation n'est admise que si les essais de biodégradabilité intrinsèque répondent à des critères spécifiques⁷.

60. Le système de dérivation des données d'entrée destinées à des modèles multimilieux et à des modèles de SEEU de l'Agence pour la protection de l'environnement des États Unis et d'Environnement

⁷ Le niveau seuil de 70 % de dégradation dans l'essai Zahn-Wellens/EMPA doit être atteint en 7 jours, phase de latence et phase logarithmique incluses, la phase de latence ne doit pas dépasser 3 jours, et le pourcentage d'élimination dans l'essai avant la biodégradation doit être inférieur à 15 %. Le niveau seuil de 70 % dans l'essai MITI modifié (II) doit être atteint en 14 jours, phase de latence et phase logarithmique incluses, et la phase de latence ne doit pas dépasser 3 jours (5).

Phase de latence : pendant la phase de latence, la croissance de microorganismes spécifiques peut être exponentielle, mais comme il sont peu nombreux, plusieurs temps de doublement sont nécessaires pour obtenir un niveau de biodégradation détectable au dessus de la valeur de base de l'inoculum.

Phase logarithmique : pendant la phase logarithmique, la croissance exponentielle de microorganismes spécifiques se poursuit et la vitesse de croissance maximale μ_{max} reste constante ; la phase logarithmique se termine avec l'épuisement de la substance de départ qui provoque une diminution de la vitesse de croissance en dessous de μ_{max} .

Canada (6)(8)(9) comprend par ailleurs des principes applicables à l'extrapolation des résultats d'essais de biodégradabilité intrinsèque aux demi-vies de boues activées dans des modèles de SEEU et dans l'eau superficielle. Un résultat négatif dans les essais de biodégradabilité intrinsèque peut entraîner une conclusion préliminaire de persistance dans l'environnement, mais ne doit pas être considéré comme une preuve irrévocable de persistance, car la concentration élevée de la substance testée peut limiter la biodégradabilité ultime en inhibant les micro-organismes responsables de la dégradation.

61. Si les microorganismes de l'essai sont inhibés par la substance testée, il est recommandé d'étudier la biodégradabilité ultime du produit chimique par un essai de simulation en utilisant une source d'inoculum réaliste, une température réaliste, et une concentration basse réaliste de la substance d'essai.

Biodégradabilité anaérobie potentielle

62. L'essai de screening pour la biodégradabilité anaérobie potentielle encore en projet (Ligne directrice 311, Biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans des boues digérées/par mesure de la production de gaz) est mis en œuvre à une température d'incubation élevée (35 °C), proche de la température dans les digesteurs chauffés pour le traitement des boues en conditions anaérobies. Cette température favorise la biodégradation anaérobie des produits chimiques avec une toxicité faible ou modérée pour les bactéries anaérobies. En revanche, la concentration élevée de la substance analysée pourrait inhiber la biodégradation ultime des produits chimiques toxiques.

63. La température utilisée dans l'essai ne permet pas de garantir que les résultats obtenus sont toujours représentatifs d'autres environnements anoxiques tels que les sédiments aquatiques. Une substance testée qui est inhibitrice dans l'essai de screening peut être à nouveau analysée à des concentrations plus faibles non inhibitrices dans un essai de simulation adéquat, par exemple la Ligne directrice 308, qui peut être pratiqué dans des conditions strictement anaérobies.

3. TRANSFORMATION ABIOTIQUE

3.1 Introduction

64. Dans les environnements aquatiques, le sol et l'air, les produits chimiques peuvent être transformés par des processus abiotiques tels que l'hydrolyse, l'oxydation et la photolyse. Il s'agit parfois d'une étape importante dans la voie de dégradation de produits chimiques artificiels dans l'environnement. Dans l'atmosphère, la transformation abiotique (oxydation par des radicaux hydroxyle) est le processus le plus important pour aboutir à la destruction complète des produits chimiques en suspension dans l'air. La transformation abiotique dans l'eau, les sédiments et le sol n'a généralement qu'une fonction de dégradation primaire, et les produits ainsi formés peuvent ensuite subir une biodégradation par des micro-organismes.

65. En général, les processus les plus importants intervenant dans la dégradation de la plupart des produits chimiques dans l'environnement aquatique sont la biodégradation ou une combinaison de dégradation par hydrolyse et de biodégradation consécutive. Dans les systèmes aquatiques, les sédiments et le sol, une hydrolyse ou une biodégradation, même lentes, prévaudront généralement sur la phototransformation, car les possibilités d'exposition à la lumière solaire dans les systèmes aquatiques sont limitées. Selon les conditions environnementales, la période de l'année et la latitude, la phototransformation peut cependant constituer une étape importante de la transformation initiale de certains produits chimiques, susceptibles de générer des produits de transformation biodégradables.

3.2 Hydrolyse

66. La transformation hydrolytique abiotique des produits chimiques dans les systèmes aquatiques peut être étudiée à des valeurs de pH normalement présentes dans l'environnement (pH 4-9) en se

conformant à la ligne directrice : hydrolyse en fonction du pH (Ligne directrice 111 révisée, adoptée le 13 avril 2004). Cette méthode est généralement applicable à des substances chimiques (marquées au ^{14}C ou non marquées) pour lesquelles une méthode analytique suffisamment précise et sensible est disponible. Les résultats d'un essai d'hydrolyse peuvent comprendre les paramètres suivants :

- Répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques ;
- Récupérations ;
- Bilan massique pendant et à la fin de l'étude (en cas d'utilisation d'une substance d'essai marquée au ^{14}C) ;
- Demi-vie ou TD_{50} .

67. La plupart des réactions d'hydrolyse se caractérisent par des vitesses de réaction apparentes du premier ordre et, par conséquent, les demi-vies sont indépendantes de la concentration, ce qui permet habituellement l'extrapolation des résultats de laboratoire déterminés entre 10^{-2} et 10^{-3} M aux conditions environnementales ($\leq 10^{-6}$ M) (10).

3.3 Phototransformation

68. Les effets potentiels du rayonnement solaire sur le devenir des produits chimiques dans l'eau superficielle et le sol, respectivement, peuvent être analysés en utilisant les lignes directrices : phototransformation des produits chimiques dans l'eau - photolyse directe et indirecte (projet, version datée d'août 2000) et phototransformation des produits chimiques sur les surfaces de sol (projet, version datée de janvier 2002).

69. La vitesse de photolyse d'un produit chimique dans l'environnement dépend de plusieurs facteurs, et en particulier de l'atténuation de la lumière solaire dans les masses d'eau naturelles et de l'intensité du rayonnement solaire, qui dépend lui-même de facteurs tels que la latitude et la saison. Toutes les données sur les demi-vies ou les valeurs de TD_{50} , TD_{75} et TD_{90} doivent faire l'objet de rapports consignants également les calculs associés à ces données, et les résultats de toutes les expériences en milieu extérieur, le cas échéant. Autant que possible, des informations sur les produits de transformation seront également communiquées.

4. LITTERATURE

- (1) OCDE (1998). OECD Ring-test of Methods for determining Ready Biodegradability.
- (2) Berg, U.T. et N. Nyholm (1996). Biodegradability simulation studies in semicontinuous activated sludge reactors with low ($\mu\text{g/l}$ range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33, 711-735.
- (3) Nyholm, N., F. Ingerslev, U.T. Berg, J.P. Pedersen et H. Frimer-Larsen (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge wastewater treatment plants using short-term batch experiments and $\mu\text{g/l}$ range spiked concentrations. *Chemosphere* 33, 851-864.
- (4) OCDE (2001). Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. Série sur les essais et évaluations de l'OCDE No. 33.

Section 3: Introduction

OECD/OCDE

- (5) Commission européenne (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new Notified Substances and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council Concerning the Placing of Biocidal Products on the Market.
- (6) U.S. Environmental Protection Agency (2000). Interim Guidance for Using Ready and Inherent Biodegradability Tests to Derive Input Data for Multimedia Models and Wastewater Treatment Plants (WWT) Models. Disponible sur le site Internet suivant : <http://www.epa.gov/oppt/exposure/docs/halflife.htm>
- (7) Wolt J.D, H.P.Nelson Jr, C.B. Cleveland, et I.J. van Wesenbeeck (2001) : Biodegradation kinetics for pesticide exposure assessment, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 169, 123-164.
- (8) BEC (Bonnell Environmental Consulting) 2001, Conducting the Multi-Media Exposure Assessment of New Substances in Canada. Final report. Préparé sous contrat pour la Division des nouvelles substances, Environnement Canada ; Ottawa, Canada. Juillet.
- (9) Webster, E., Mackay D., Wania, F, Arnot, J., Gobas, F., Guoin, T., Hubbarde, J. et M. Bonnell. 2005, Development and Application of Models of Chemical Fate in Canada. Final Report to Environment Canada Contribution Agreement 2004-2005. Canadian Environmental Modelling Network, Peterborough, Ontario. Mars.
- (10) Mabey, W. et Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

PARTIE 2 : BIOACCUMULATION ET COMPORTEMENT DANS LES SOLS ET LES SEDIMENTS

NOTE : RELATIVEMENT PEU DE LIGNES DIRECTRICES NOUVELLES OU REVISEES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES ONT ETE PUBLIEES EN CE QUI CONCERNE L'ACCUMULATION ET LE DEVENIR DANS LES SOLS ET LES SEDIMENTS DEPUIS QUE CETTE ANNEXE A ETE INITIALEMENT APPROUVEE. NEANMOINS, LE TEXTE CI-DESSOUS EST EN COURS DE REVISION (ET UN DOCUMENT D'EXAMEN DETAILLE CONCERNANT LA BIOACCUMULATION EST AUSSI REDIGE EN VUE DE DETERMINER LES PRIORITES POUR LES TRAVAUX FUTURS SUR LES LIGNES DIRECTRICES POUR LES ESSAIS).

BIOACCUMULATION**1. GENERALITES**

1. L'importance réelle de la bioaccumulation d'un produit chimique à un instant donné est la combinaison des processus compétitifs que sont la consommation, la répartition, la transformation et l'excrétion. Si le produit chimique est susceptible d'être consommé par l'organisme pendant une certaine durée, les quatre processus conjugués engendrent un équilibre dynamique (plateau apparent ou état stationnaire) caractérisé par un taux constant de la concentration du produit dans l'organisme étudié et dans le milieu ambiant (par exemple l'eau) ou dans la nourriture. Ce taux est la quantification mathématique de la bioaccumulation

2. On peut affirmer qu'un produit chimique qui ne subit pas de transformation métabolique immédiate peut manifester son potentiel de bioaccumulation, encore qu'à un degré différent, dans de nombreuses espèces, pourvu qu'il soit présent dans l'environnement ambiant et/ou dans la nourriture de ces espèces pendant une période suffisamment longue.

3. Au cours de l'étude des processus de bioaccumulation, il s'est révélé commode expérimentalement d'examiner séparément les deux voies possibles de consommation : bioaccumulation directe à partir du milieu ambiant et bioaccumulation indirecte par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire.

4. Sur la base des connaissances rassemblées au cours de ces dernières années, la bioaccumulation directe prédomine de façon non équivoque sur la bioaccumulation indirecte dans l'environnement aquatique, alors que la bioaccumulation indirecte est le mécanisme dominant chez les animaux terrestres.

5. Un examen critique des différentes situations de l'environnement dans lesquelles ont lieu des processus de bioaccumulation est nécessaire pour choisir des systèmes d'essai de laboratoire appropriés, dont les résultats puissent être utilisés de façon sûre pour évaluer la bioaccumulation potentielle d'un produit chimique dans l'environnement.

2. BIOACCUMULATION DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE

6. Deux approches expérimentales différentes sont utilisées pour étudier la bioaccumulation dans les organismes aquatiques : les systèmes d'essai intégrés (écosystèmes, chaînes alimentaires) et les systèmes d'essai sectoriels (organismes individuels ou étapes de la chaîne alimentaire). Ces deux approches permettent de révéler clairement le potentiel de bioaccumulation d'un produit chimique. Cependant, la

dernière formule soulève moins de problèmes en ce qui concerne la manipulation, la reproductibilité des résultats absolus qui ont été obtenus, et la mise en évidence des facteurs individuels responsables du processus de bioaccumulation.

7. Le Groupe d'experts a examiné les différences qui existent entre les systèmes dynamiques et les systèmes statiques. La concentration d'un produit chimique dans des conditions stationnaires à l'intérieur d'un système statique est normalement plus basse que la concentration initiale. Dans des conditions extrêmes, ceci peut entraîner des problèmes analytiques qui exigent que les mesures soient effectuées dans des conditions dynamiques.

8. En ce qui concerne la bioaccumulation directe dans une espèce particulière, il existe une nette corrélation entre la bioaccumulation et la lipophilie [exprimée sous la forme du coefficient de partage (n-octanol/eau) = P_{oe}] des produits chimiques organiques non ionisés. Bien que l'on connaisse des exceptions, celles-ci sont en général reliées à des cas où le P_{oe} est supérieur au FB (facteur de bioconcentration). On peut donc considérer le coefficient de partage P_{oe} comme un moyen raisonnable de prédire la bioaccumulation de ces produits chimiques. Plus un produit chimique est lipophile (c'est-à-dire plus son P_{oe} est élevé), plus lentement il sera désorbé, c'est-à-dire éliminé de l'organisme. On ne peut pas toujours décrire l'épuration par une cinétique de premier ordre. On ne doit donc pas extrapoler le temps de demi-vie apparente au-delà de l'intervalle mesuré.

9. Il peut y avoir des cas où la réaction d'un produit chimique dans un organisme vivant peut engendrer des dérivés qui sont plus lipophiles que le produit initial, ou peut former des liaisons entre le produit ou des parties du produit et des constituants de la cellule (par exemple, mercure inorganique → méthylmercure → produit de réaction avec des constituants de la cellule). Dans le premier cas, la bioaccumulation du produit dérivé sera plus importante que ce que laissait attendre le P_{oe} du produit de départ. Dans le second cas, la rétention du produit chimique lié dépendra de la stabilité de la liaison et de la demi-vie métabolique du constituant de la cellule auquel il est lié. Les produits minéraux et organométalliques sont parmi les candidats capables d'un tel comportement. Certains produits chimiques ionisés dans des conditions physiologiques peuvent aussi être considérés comme susceptibles d'avoir ce comportement si on ne peut pas évaluer l'incidence de la formation de complexes ou de paires d'ions sur leur bioaccumulation. Dans ce cas, le P_{oe} ne permet pas de prévoir correctement le potentiel de bioaccumulation.

10. Chez les poissons, on a démontré que le taux de lipides avait une influence décisive sur l'ordre de grandeur du FB. On peut probablement diminuer l'importance d'autres sources de variation par une harmonisation plus stricte des conditions d'essai (par exemple rapport volume de la biomasse/volume d'eau, rapport biomasse/concentration du produit chimique, calendrier d'échantillonnage, alimentation des poissons étudiés, etc.).

11. L'interprétation des différents FB mesurés pour un produit donné et pour différentes espèces de poissons peut être facilitée en comparant la valeur mesurée à la valeur d'un composé étalon dont la stabilité est connue et dont le comportement concernant la bioaccumulation est comparable (par exemple, rapport FB du produit étudié / FB de référence, c'est-à-dire indice de bioaccumulation). Des études de comparaison en laboratoire ont été menées pour assurer l'applicabilité et la validité des cinq essais d'accumulation recommandés chez les poissons.

3. ENVIRONNEMENT TERRESTRE

12. La consommation des produits chimiques par les animaux terrestres se fait principalement par la nourriture. La voie cutanée peut contribuer à cette consommation dans une certaine mesure, pour les animaux qui vivent sous la terre. Une consommation significative par voie aérienne est plutôt

exceptionnelle. En conséquence, on s'attend à ce que les espèces au sommet des chaînes alimentaires révèlent les plus fortes concentrations de substances possédant un potentiel de bioaccumulation et entrant dans ces chaînes à un niveau inférieur.

13. Chez les mammifères et les oiseaux, on a montré que dans des conditions constantes de consommation, on atteint aussi un équilibre dynamique se manifestant par une concentration constante du produit chimique dans certains organes et tissus des animaux d'essai (plateau apparent). La vitesse avec laquelle cet équilibre est atteint et le niveau de cet équilibre sont caractéristiques d'un produit et d'une espèce donnés, ainsi que de la concentration du produit chimique dans la nourriture. La même chose est vraie pour le taux d'épuration/excrétion observé après arrêt de l'exposition.

14. En utilisant comme mesure le rapport des concentrations dans le tissu concerné au niveau plateau et dans la nourriture, c'est-à-dire le facteur de bioaccumulation (FB), ces études montrent également que le FB des produits chimiques chez les animaux terrestres est d'un ordre de grandeur plus faible que celui trouvé chez les animaux aquatiques tels que les poissons.

15. Des études réalisées sur les mammifères et les oiseaux ont confirmé la valeur des résultats obtenus avec les organismes aquatiques : la lipophilie d'un produit chimique de stabilité métabolique suffisante est la propriété qui détermine essentiellement le degré de bioaccumulation. En conséquence, le coefficient de partage n-octanol/eau constitue aussi un bon moyen de déterminer la probabilité qu'un produit chimique organique non ionisé s'accumule dans les tissus lipidiques des animaux terrestres.

16. En ce qui concerne les plantes, la probabilité d'exposition importante à des produits chimiques organiques est faible si l'on exclut une utilisation intentionnelle dans ou sur le sol. Si ces produits sont absorbés, en général ils ne s'accumulent pas. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer des essais de bioaccumulation chez les plantes.

4. PHILOSOPHIE DE BASE DES EXPERIMENTATIONS DE BIOACCUMULATION

17. Les essais sur le potentiel de bioaccumulation d'un produit donné doivent procéder par étapes afin d'augmenter progressivement l'étendue et le degré des informations obtenues, ainsi que les efforts expérimentaux à fournir. Cette approche séquentielle doit coïncider avec les approches sélectionnées dans les essais de biodégradation et d'écotoxicité, afin de permettre une harmonisation optimale du programme complet d'essais.

18. La décision de ne pas tester un produit chimique organique non ionisé sera basée sur l'évaluation simultanée de ses propriétés physico-chimiques significatives et de sa dégradabilité. Par exemple, si un produit est facilement biodégradable, selon la définition vue plus haut dans le paragraphe "Biodégradation dans l'eau", aucun essai de bioaccumulation n'est nécessaire. La biodégradation aboutit habituellement à des produits qui ont partiellement ou totalement perdu leur potentiel original de bioaccumulation.

19. Pour les composés minéraux et organométalliques, on ne peut pas évaluer le potentiel de bioaccumulation de façon sûre par la détermination du coefficient de partage n-octanol/eau. De tels composés doivent faire l'objet d'un essai de bioaccumulation chez le poisson, essai qui, à ce stade de "screening", sera un essai statique.

20. Pour les composés organiques qui s'ionisent dans les conditions physiologiques (pH 3-9), l'utilisation du coefficient de partage n-octanol/eau ne permet de faire des prédictions sur la bioaccumulation que s'il existe des preuves que le produit ne montre aucune réactivité envers les constituants de la cellule.

21. Si ces preuves ne peuvent pas être fournies, on doit réaliser un essai de bioaccumulation chez le poisson pour le composé de départ ou pour les produits provenant de sa transformation rapide, à moins que l'on sache que ce composé est facilement dégradé. Au stade de "screening", un essai statique peut être suffisant, s'il est applicable.

COMPORTEMENT DANS LES SOLS ET LES SEDIMENTS

22. L'étude du devenir des produits chimiques dans les sols ou les sédiments présente une importance particulière puisque la contamination peut être de longue durée et difficilement réversible à cause des possibilités limitées de mobilisation et de dilution.

23. Quand on réalise les essais de biodégradation ou quand on détermine le coefficient d'adsorption, la structure du sol est généralement détruite, par exemple par le tamisage ou le lavage, alors que la texture est maintenue. Ceci est de peu d'importance pour la détermination du potentiel de dégradabilité.

24. Cependant, dans les cas exceptionnels pour lesquels il est indiqué de réaliser en fin de compte une étude sur un modèle environnemental réaliste, il est essentiel d'inclure le sol et les sédiments dans le système d'essai, de telle façon que leur structure reste inchangée du point de vue fonctionnel, en utilisant par exemple des monolithes de sol dans le cadre d'expériences sur le terrain.

25. On doit – dans toute la mesure du possible – fournir des informations détaillées sur des propriétés particulières du sol (par exemple, texture, teneur en argile, teneur en carbone organique, etc.). Ces spécifications varient en fonction du but poursuivi par l'essai. On recommande l'utilisation de types spécifiques de sols pour assurer une large acceptabilité des résultats.

26. Pour la caractérisation des sols, le Groupe d'experts recommande l'utilisation du système américain de classification des sols (Soil Survey Staff and Collaborators, 1967). Afin de mettre au point une ligne directrice pour les essais d'adsorption, le groupe a identifié trois types de sols. Puisque ces types de sols offrent une gamme de possibilités, ils sont également recommandés pour les études de biodégradation et/ou de lixiviation. Ils offrent une souplesse suffisante et varient de façon significative en ce qui concerne, par exemple, la capacité d'échange de cations, la teneur en argile, la teneur en matières organiques, les cations échangeables et le pH.

27. En résumé, ils peuvent être décrits comme suit :

- (1) sol sablonneux de très fortement acide à fortement acide, par exemple spodosol ;
- (2) sol argileux modérément ou faiblement acide, par exemple alfisol ;
- (3) sol argileux de neutre à faiblement alcalin, par exemple entisol.

Ces trois types de sol sont communs dans les zones tempérées mais ne sont pas représentatifs des régions arides ou tropicales.

28. Le sol doit être caractérisé par les paramètres suivants : pH, teneur en argile, potentiel redox (Eh), matières organiques, équilibre nutritif (N, P, K). Dans le cas d'études sur colonne, on doit déterminer le volume des pores. Il est recommandé d'utiliser régulièrement, au cours de chaque expérience, un produit chimique témoin pour vérifier l'activité microbienne du sol.

29. Le Groupe d'experts pense qu'on peut utiliser des sols imbibés d'eau et perfusés par un gaz inerte, pour simuler de façon acceptable des sédiments en conditions anaérobies. Après avoir imprégné les sols d'eau, on doit prendre soin de prévoir une période adéquate pour l'acclimatation de la microflore et la stabilisation du potentiel redox.