



Section 3
Devenir et comportement dans
l'environnement

Essai n° 320:
Transformation anaérobie dans le lisier

30 juin 2022

Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques

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

Transformation anaérobie dans le lisier

1. Introduction

1. La présente ligne directrice décrit des méthodes d'étude de la transformation des produits chimiques dans le lisier de porcs ou de bovins en conditions anaérobies. Elle s'appuie sur des méthodes dont la conception et la validation sont décrites dans la littérature [1, 2, 3], ainsi que sur des lignes directrices existantes [4, 5]. Les essais réalisés visent à déterminer la vitesse de transformation du produit chimique d'essai, l'identité et la vitesse de formation et de disparition des produits de transformation, la quantité de produit chimique d'essai qui est minéralisée en CO₂ ou CH₄ ou transformée en produits volatils, et la quantité de résidus non extractibles (RNE). Ces études sont applicables aux produits chimiques administrés aux animaux d'élevage puis excrétés (médicaments vétérinaires ou additifs alimentaires, par exemple), ainsi qu'aux produits chimiques qui sont utilisés dans les locaux d'élevage et peuvent se retrouver dans le lisier provenant de ces bâtiments (biocides, par exemple). Des pesticides peuvent également être introduits dans le lisier par le biais d'aliments pour animaux contaminés.

2. Définitions

2. Pour les définitions, voir l'annexe 1.

3. Remarques préliminaires et limites

3. La méthode est applicable à tous les produits chimiques pour lesquels on dispose d'une méthode analytique offrant un taux de récupération, une exactitude et une sensibilité suffisantes. Elle s'applique aux produits faiblement volatils, non volatils, solubles dans l'eau ou peu solubles dans l'eau. La méthode décrite dans cette ligne directrice n'est pas adaptée aux produits chimiques volatils. En cas d'utilisation d'un système d'essai clos (semi-statique ou dynamique), il est possible de tester des substances faiblement volatiles (constante de Henry < 100 Pa.m³/mol ou < 1×10⁻³ atm.m³/mol). Avant d'envisager de tester des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester ou des produits à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de s'interroger sur la validité scientifique des résultats d'un tel essai. Si la Ligne directrice est utilisée pour tester un mélange, un UVCB (substance de composition inconnue ou variable, produit de réaction complexe ou matériel biologique) ou une substance multiconstituant, la composition du produit chimique d'essai devra être caractérisée dans la mesure du possible, par exemple

par l'identité chimique de ses constituants, leur quantité et leurs propriétés spécifiques. On trouvera des recommandations pour la mise à l'essai des produits chimiques difficiles à tester (tels que les mélanges, UVCB ou substances multiconstituants) dans le Document guide de l'OCDE n° 23 [6].

4. Principe de l'essai

4. Des échantillons de lisier additionnés du produit chimique d'essai sont incubés dans l'obscurité, en conditions de laboratoire contrôlées (température constante, conditions anaérobies, voir aussi le paragraphe 35). À intervalles de temps appropriés, les échantillons de lisier sont successivement repris en vue de l'extraction et de l'analyse de la substance parente et des produits de transformation. Les produits volatils sont recueillis pour analyse au moyen de dispositifs de piégeage adaptés, afin de quantifier la formation de CO₂, de CH₄ et d'autres produits volatils le cas échéant. L'utilisation de matériel marqué au ¹⁴C permet de mesurer les vitesses de minéralisation du produit chimique d'essai et d'établir un bilan massique, incluant la formation de RNE. À partir des résultats, on peut calculer le TD₅₀ et, s'il y a lieu, le TD₉₀.

5. La présente ligne directrice doit permettre d'étudier la transformation des produits chimiques dans le lisier de porcs et de bovins, c'est-à-dire un mélange d'urine, de fèces et d'eau qui peut aussi contenir de la litière. Il a été établi que la teneur en matière sèche du lisier de porcs et de bovins est généralement de 5 % et 10 % respectivement [7].

5. Informations sur le produit chimique d'essai

6. La vitesse de dissipation du produit chimique parent peut être mesurée sur des produits chimiques d'essai non marqués ou marqués. Un produit radiomarqué au ¹⁴C sera nécessaire pour étudier la voie de transformation, quantifier la formation de CO₂ et CH₄, la formation de RNE, identifier et quantifier les produits de transformation et établir un bilan massique. Le(s) marqueur(s) doivent être placés dans la ou les parties les plus stables de la molécule. Pour le suivi de la fraction active, le(s) marqueur(s) doivent être positionnés en conséquence. Pour les molécules complexes (contenant, par exemple, plus d'un cycle aromatique) ou les molécules fortement substituées, il peut être nécessaire de placer des marqueurs à différents endroits. Le produit chimique d'essai doit être marqué de façon à permettre de retracer autant que possible la voie de transformation, et de suivre les produits de transformation. La/les position(s) des marqueurs doivent être justifiées et illustrées, dans le rapport d'essai, par un schéma de la formule développée du produit chimique d'essai.

7. L'utilisation d'isotopes stables tels que ¹³C, ¹⁵N ou ²D (non échangeable) peut aider à identifier les produits de transformation ou à caractériser les RNE par différentes méthodes spectroscopiques (spectrométrie de masse (MS, *mass spectrometry*) ou résonance magnétique nucléaire (NMR, *nuclear magnetic resonance*), par exemple).

8. La pureté du produit chimique d'essai doit être d'au moins 95 %. Les écarts devront être justifiés.

9. Avant de procéder à l'essai de transformation dans le lisier, il est souhaitable de disposer des informations suivantes sur le produit chimique d'essai :

- a solubilité dans l'eau (LD 105 de l'OCDE ; [8]),
- b solubilité dans les solvants organiques,

- c pression de vapeur (LD 104 de l'OCDE ; [9]) et constante de Henry,
- d coefficient de partage octanol/eau (LD 107 de l'OCDE ; [10]),
- e stabilité chimique dans l'eau (hydrolyse) (LD 111 de l'OCDE ; [11]),
- f constante de dissociation pK_a si la molécule est sujette à une protonation ou une déprotonation (LD 112 de l'OCDE ; [12]),
- g comportement sorbant (LD 106 de l'OCDE ; [13]).

10. D'autres informations concernant notamment la toxicité du produit chimique d'essai ou de ses produits de transformation à l'égard des micro-organismes, établies par exemple selon les lignes directrices de l'OCDE 209 [14], 216 [15], 217 [16] ou 224 [17], peuvent également être utiles.

11. Il convient de disposer de méthodes analytiques (méthodes d'extraction et de purification, notamment) permettant de quantifier et d'identifier le produit chimique d'essai et ses produits de transformation. Des étalons analytiques, lorsqu'ils existent, doivent être utilisés pour la caractérisation et/ou l'identification des produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques. Si de tels étalons ne sont pas disponibles, une identification basée sur des techniques spectrométriques (spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS, *high resolution mass spectrometry*) et spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (NMR, *nuclear magnetic resonance*) peut être tentée.

6. substance de référence et démonstration des compétences

12. Une substance de référence peut être incluse dans l'essai afin de vérifier que la configuration de l'essai et l'activité microbienne dans le lisier sont appropriées. Facilement dégradé dans les conditions de l'essai, l'acide salicylique, par exemple (sous forme de salicylate de sodium, CAS : 54-21-7 ou d'acide salicylique, CAS : 69-72-7), peut être utilisé à cette fin [3]. Il convient de consigner les mêmes résultats pour la substance de référence que pour le produit chimique d'essai. On trouvera à l'annexe 2 un schéma d'extraction pour l'acide salicylique.

7. Validité de l'essai

13. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :
- L'essai doit être réalisé dans les conditions d'oxydo-réduction caractéristiques des réservoirs de lisier¹. Utilisé comme indicateur, le potentiel redox (consigné sous la forme E_h) doit être ≤ -100 mV pendant toute la durée de l'essai².

Les valeurs habituellement mesurées dans les réservoirs de lisier se situent entre -230 mV et -400 mV [7]. Lors de la validation, les valeurs moyennes observées pour E_h étaient de -374 ± 54 mV pour le lisier de porcs et -316 ± 110 mV pour le lisier de bovins [2].

² Voir aussi au paragraphe 35.

- Pour les produits chimiques radiomarqués, le bilan massique au début de l'étude doit être compris entre 90 % et 110 %. Au cours de l'étude, il doit se situer pour chaque réplicat entre 85 % et 115 %³.
- Que les produits chimiques d'essai soient marqués ou non marqués, il faut avoir apporté la preuve que la méthode analytique offre un taux de récupération de 70-110 %⁴.

8. Description de la méthode d'essai

8.1. Appareillage et réactifs chimiques

14. Il convient de disposer de l'équipement de laboratoire standard, en particulier des matériels suivants :

- Instruments d'analyse tels que GC ou HPLC, incluant des systèmes de détection appropriés pour l'analyse de substances radiomarquées ou non marquées,
- Instruments d'identification (tels que RAM, MS, HRMS, NMR, etc.),
- Compteur à scintillation liquide,
- Oxydateur pour la combustion des échantillons avant analyse de la radioactivité,
- Centrifugeuse,
- Appareillage d'extraction (tel que tubes de centrifugation pour l'extraction à froid, extracteur de Soxhlet pour l'extraction en continu sous reflux, système d'extraction accélérée par solvant, c'est-à-dire extraction à pression et température élevées),
- Instruments permettant de concentrer les solutions et les extraits (évaporateur rotatif, par exemple),
- Bain-marie,
- Dispositif de mélangeage mécanique (malaxeur, mélangeur rotatif, mixeur à main, par exemple).

15. Les réactifs chimiques utilisés sont notamment les suivants :

- NaOH, grade analytique (2 M), ou autre base appropriée (KOH, éthanolamine, par exemple),
- Ba(OH)₂, grade analytique (0.25 M),
- H₂SO₄, grade analytique (0.05 M),
- HCl (10 %), grade analytique,
- Solvants organiques, grade analytique, tels que l'acétone, le méthanol, etc.,

³ Si, après le temps T zéro, un réplicat ne satisfait pas au critère de 85-115 %, il doit être exclu de l'évaluation. L'étude peut néanmoins être considérée comme valide si une justification valable est fournie et qu'il reste suffisamment de réplicats à un nombre suffisant de moments d'échantillonnage pour l'évaluation.

⁴ Se rapporter également aux documents relevant de la validation des méthodes analytiques, par exemple (OECD, 2014) [18].

- Sels inorganiques, grade analytique, tels que KH_2PO_4 (pour les solvants d'extraction),
- Liquide de scintillation.

9. Configuration de l'essai

16. L'incubation se déroule dans un système adapté. Des exemples d'appareils d'incubation semi-statiques ou dynamiques sont présentés respectivement à l'annexe 3 et à l'annexe 4. D'autres systèmes d'incubation sont décrits dans les références ([4] et [5]). Pour les substances dont la minéralisation est faible ou nulle, un système dynamique ou semi-statique peut être utilisé. Pour les substances donnant lieu à une minéralisation plus élevée (d'après la littérature ou les résultats d'un test préalable), on préférera un système semi-statique [3].

17. Les conditions anaérobies sont assurées en faisant passer un flux d'azote humidifié sur les échantillons, au début de l'essai puis par intermittence (dans le cas d'un système semi-statique), ou en continu (pour un système dynamique), le débit d'azote recommandé étant de 50 à 200 mL/min. Des pièges remplis de NaOH (ou d'une autre solution de piégeage appropriée) sont utilisés pour piéger le CO_2 émis. Le méthane (CH_4) potentiellement formé s'accumule dans le flacon d'incubation (il n'y a pas à craindre de surpression, système semi-statique) ou passe dans les pièges à CO_2 (système dynamique) avant combustion dans un four (voir les températures en annexe) pour former du CO_2 qui est finalement piégé dans un piège à CO_2 . On trouvera une description détaillée du dispositif à l'annexe 3 (système semi-statique) et à l'annexe 4 (système dynamique). Pour vérifier que la radioactivité piégée dans les pièges à CO_2 est bien due à $^{14}\text{CO}_2$ et ne provient pas d'acides gras volatils (AGV), qui peuvent également se former, il est possible de procéder à une précipitation des éléments radioactifs par $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Selon le produit chimique d'essai et ses produits de transformation éventuels, d'autres pièges (éthylène glycol, acide sulfurique, par exemple) peuvent être nécessaires pour recueillir les composés organiques volatils.

18. Un test préliminaire peut fournir des indications utiles sur le comportement du produit chimique d'essai et de ses produits de transformation (dans certains cas, par exemple, on peut observer une dissipation rapide du produit chimique d'essai, conduisant à ajuster en conséquence les moments d'échantillonnage, ou la dissipation peut être lente et imposer de prolonger la durée de l'étude).

10. Lisier

10.1. Choix du lisier

19. Le lisier utilisé pour l'essai doit provenir de réservoirs de stockage ou de pré-stockage de lisier ou de lagunes à lisier. Les systèmes de stockage peuvent être installés en surface ou en subsurface. Le lisier ne doit pas avoir été exposé au produit chimique d'essai ou à des composés appartenant à la même classe de substances au cours des six mois précédant le prélèvement. Il convient d'en apporter la preuve en recueillant des informations sur les traitements administrés aux animaux produisant le lisier (médicaments vétérinaires ou additifs alimentaires, notamment) et sur les biocides et autres produits chimiques utilisés dans les locaux d'élevage (désinfectants ou insecticides, notamment) au cours des six mois précédant l'étude. Il est recommandé de procéder à une vérification

analytique des résidus chimiques, en particulier s'il y a lieu de penser que des résidus provenant du traitement des cultures peuvent se trouver dans les sources d'alimentation. Le nombre, le type et l'âge des animaux doivent être connus, ainsi que leur mode d'alimentation. Les études sur la transformation dans le lisier doivent être menées sur le lisier de l'espèce considérée (porcs, bovins, par exemple), l'extrapolation d'une espèce à une autre n'étant pas possible. Voir aussi les paragraphes 24-25 sur la caractérisation du lisier. On utilisera au moins un lisier par espèce⁵. Si plusieurs lisiers ont été échantillonnés et se sont révélés inadaptés du fait, par exemple, de la non-conformité des paramètres de la matrice aux spécifications, les résultats seront néanmoins consignés dans le rapport.

10.2. Collecte, traitement et stockage du lisier

10.2.1. Prélèvement du lisier de porcs et de bovins

20. Avant la collecte, le lisier doit être homogénéisé par mélangeage dans le réservoir. Des dispositifs installés dans le réservoir ou des dispositifs externes peuvent être utilisés à cette fin. Le lisier doit être mélangé pendant une heure au moins avant le prélèvement. Il a été établi que cette durée était suffisante pour homogénéiser le lisier, indépendamment du volume du réservoir [19]. En ce qui concerne l'intervalle de temps entre le mélangeage et le prélèvement, il faut tenir compte du fait que le lisier de porcs se sépare en différentes phases plus rapidement que le lisier de bovins. Le lisier de porcs doit donc être prélevé immédiatement après le mélangeage, alors qu'il peut s'écouler jusqu'à une journée entre le mélangeage du lisier de bovins et son prélèvement.

21. Le lisier peut être prélevé du réservoir au moyen d'un grand béccher pourvu d'un long manche, par exemple. Les récipients seront remplis au maximum à 75 % environ de leur capacité, et fermés de façon étanche. Des produits gazeux continueront à se former du fait de l'activité microbienne, donc il est suggéré de raccorder un tube muni d'un sas de fermentation à une sortie du récipient.

22. On consignera tous les détails relatifs au site de prélèvement, à la procédure de prélèvement (moment et durée du mélangeage), au type de réservoir (au-dessus du sol/enfoui, couvert/à l'air libre, notamment) et à la taille du réservoir.

10.2.2. Stockage du lisier

23. Le lisier destiné à l'essai sera de préférence fraîchement collecté dans le réservoir. En cas d'impossibilité, il peut être stocké jusqu'à deux mois entre 4 °C et 20 °C (à la température d'essai, de préférence). Les précautions décrites au paragraphe 21 pour la production de gaz doivent être appliquées. Le stockage doit assurer des conditions anaérobies/méthanogènes (voir le paragraphe 35).

10.3. Caractérisation du lisier

24. Le tableau ci-après résume les principaux paramètres à mesurer et à faire figurer dans le rapport (en indiquant la méthode utilisée), et le stade de l'essai auquel ces paramètres doivent être établis.

25. Mesure des paramètres caractérisant le lisier :

	Stade de l'essai

⁵ Le nombre de lisiers doit être conforme aux exigences du cadre réglementaire applicable (médicaments vétérinaires, biocides, par exemple). Voir l'annexe 6 pour plus de précisions.

Paramètre ⁶	Prélèvement	Début de l'acclimatation	Début de l'essai	Au cours de l'essai	Fin de l'essai
pH ⁷	X	X	X	X	X
teneur en matière organique [%] ⁸		X			
teneur en azote [N _{total} ; mg/kg] ⁹		X			
teneur en azote [NH ₄ -N; mg/kg] ¹⁰		X			
potentiel redox [mV] ¹¹	X	X	X	X ¹²	X
teneur en matière sèche [%] ¹³	X	X	X		X
poids humide du lisier ¹⁴		X			X
température [°C]	X	X	X	X	X

26. Les données recueillies après le stade du prélèvement (c'est-à-dire au début de l'acclimatation, au début de l'essai, pendant l'essai et à la fin de l'essai) doivent être consignées sur la base de la teneur en matière sèche ajustée et du poids humide du lisier.

27. Un échantillon témoin ou blanc doit être analysé pour exclure la présence du produit chimique d'essai dans le lisier.

28. Sauf pour la teneur en matière sèche (voir le paragraphe 29), il n'est pas nécessaire d'apporter des modifications ou des ajustements aux échantillons de lisier.

10.4. Teneur en matière sèche et homogénéisation du lisier

29. Avant la période d'acclimatation (voir les paragraphes 32 et 33), la teneur du lisier en matière sèche doit être déterminée et ajustée si nécessaire. La teneur recommandée pour le lisier de porcs et de bovins est de 10 ± 1 % (m/m) et 5 ± 1 % (m/m), respectivement [7]. Si la teneur en matière sèche est inférieure à la valeur recommandée, il est possible de concentrer le lisier en le centrifugeant avec précaution (10 min à $740 \times g$, par exemple). Toutefois, la teneur initiale en matière sèche doit être ≥ 8 % (bovins) ou ≥ 3 % (porcs). Si

⁶Le rapport doit spécifier, pour chacun des paramètres de la matrice, s'il se rapporte à la masse sèche ou à la masse humide de l'échantillon.

⁷ par exemple ISO 10390 « Qualité du sol -- Détermination du pH » [20]

⁸ par exemple DIN 12879 „Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse” [21]

⁹ par exemple ISO 11261 « Qualité du sol – Dosage de l'azote total – Méthode de Kjeldahl modifiée » [22]. Pour la conversion des unités de masse en unités de volume, une densité de 0.001 kg/m^3 est utilisée

¹⁰ par exemple ISO 5664 « Qualité de l'eau – Dosage de l'ammonium – Méthode par distillation et titrimétrie » [23].

¹¹ par exemple ISO 11271 « Qualité du sol - Détermination du potentiel d'oxydoréduction – Méthode de terrain » [24] et/ou DIN 38404-6 “Determination of the oxidation reduction (redox) potential” [25]

¹² Il convient de veiller à ce que les spécifications relatives au potentiel redox soient respectées tout au long de l'étude. Un minimum de trois mesures réalisées à des intervalles de temps égaux est donc recommandé au cours de l'essai.

¹³ par exemple DIN EN 12880 “Characterization of sludges - Determination of dry residue and water content” [26]

¹⁴ pour chaque récipient d'incubation

ces valeurs minimales ne sont pas atteintes, il convient de collecter du lisier frais destiné à l'essai. Si la teneur en matière sèche est trop élevée, on ajoutera la quantité d'eau nécessaire (eau déminéralisée, bullée à l'azote pendant 30 min).

30. Avant de déterminer et d'ajuster (si nécessaire) la teneur en matière sèche, il convient d'homogénéiser le lisier. Le lisier de porcs doit être homogénéisé en conditions anaérobies, pour que la phase soit assez stable. Pour ce faire, on peut verser le lisier dans un bécher et le mélanger/l'homogénéiser (au moyen d'un mélangeur à main, par exemple), en faisant passer doucement un flux d'azote sur le lisier tout en le mélangeant. On peut homogénéiser le lisier de bovins en le mélangeant doucement (à l'aide d'une tige de verre, par exemple), aucune mesure supplémentaire n'étant nécessaire dans ce cas pour prévenir l'introduction d'oxygène. Mais il est également possible d'appliquer au lisier de bovins la même procédure qu'au lisier de porcs pour prévenir l'introduction d'oxygène.

31. Après ajustement de la teneur en matière sèche, le lisier est homogénéisé à nouveau (selon la procédure décrite plus haut) et des sous-échantillons de 50 – 100 g (poids humide) chacun sont versés directement dans les récipients d'incubation utilisés pour l'acclimatation et l'étude de transformation.

10.5. Acclimatation du lisier

32. Si un appareil semi-statique (voir l'annexe 3) est utilisé, le système d'incubation est balayé à l'azote pendant 1 heure pour maintenir des conditions anaérobies. Le système est ensuite fermé par des vannes. Si c'est un appareil dynamique qui est utilisé (voir l'annexe 4), le système d'incubation doit être fermé et un flux d'azote saturé d'eau passe constamment sur le lisier à un débit de l'ordre de 50 à 200 mL/min.

33. L'acclimatation doit durer 21 ± 1 jours à la température d'essai dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse.

11. Conditions de l'essai

11.1. Température et conditions d'éclairage lors de l'essai

34. L'incubation doit se dérouler dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse, à une température contrôlée (± 2 °C), qui peut être la température du lieu de prélèvement ou une température standard de 20 °C. La température du lieu de prélèvement peut être soit la température réelle de l'échantillon au moment du prélèvement, soit la température moyenne du site de prélèvement [7]. Les valeurs TD_x résultantes peuvent être converties compte tenu des températures pertinentes du point de vue de l'environnement [27]. Pour déterminer la voie de transformation, il peut être nécessaire d'utiliser des températures pertinentes pour l'environnement¹⁵.

11.2. Conditions d'incubation anaérobies

35. Les études de transformation dans le lisier de bovins et de porcs doivent être réalisées dans des conditions d'oxydoréduction similaires à celles qui sont observées dans un réservoir de lisier. Les valeurs couramment mesurées pour le potentiel redox du lisier

¹⁵ Si des produits de transformation ne peuvent pas être identifiés à des températures relativement basses, des températures plus élevées peuvent être utilisées en complément pour cet objectif spécifique.

de porcs ou de bovins se situent entre -230 mV et -400 mV [7]. Le potentiel redox doit être mesuré¹⁶ et consigné régulièrement, afin qu'il soit certain que les conditions anaérobies ont été stables tout au long de l'essai (voir le paragraphe 25). E_h ne doit jamais dépasser -100 mV [5] (voir aussi les critères de validité du paragraphe 13).

11.3. Témoins abiotiques

36. Pour obtenir des informations sur la transformation abiotique du produit chimique d'essai, il est recommandé d'inclure des témoins stériles dans l'essai. Ces derniers sont obligatoires pour les produits chimiques d'essai subissant une transformation abiotique rapide. Les témoins stériles peuvent fournir des informations supplémentaires sur le type de transformation qui se produit. Du lisier est stérilisé, additionné de produit chimique d'essai stérile, et les flacons sont maintenus fermés. L'échantillonnage des témoins stériles doit se faire selon le planning d'échantillonnage fixé, mais le nombre de moments d'échantillonnage peut être réduit. Les témoins stériles doivent être échantillonnés au minimum à la fin de l'essai. La stérilisation peut être réalisée par autoclavage à deux reprises au moins selon le protocole suivant : préchauffer le lisier dans les récipients d'essai pendant une nuit (12 h minimum) à 100 °C. Laisser les récipients refroidir à température ambiante pendant la journée. Commencer le premier cycle d'autoclavage (15 min, 121 °C) et laisser les récipients refroidir à nouveau à température ambiante pendant la nuit pour permettre la germination des spores bactériennes. Puis démarrer le second cycle d'autoclavage (15 min, 121 °C). Cette procédure aide à inactiver les spores bactériennes et prévient la formation de mousse. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour stopper l'activité biologique, s'il y a lieu (ajout d'un toxique, irradiation gamma, par exemple)¹⁷.

11.4. Traitement et application du produit chimique d'essai

37. Le produit chimique d'essai doit être ajouté au lisier à une concentration reflétant la concentration maximale attendue dans le lisier, qui dépend des scénarios d'exposition spécifiques de la substance. Des concentrations de l'ordre du mg/kg sont couramment observées par exemple pour les médicaments vétérinaires dans le lisier [1]. Les raisons conduisant à choisir une concentration donnée doivent être indiquées dans le rapport. Si la concentration est insuffisante pour la détection et l'identification des produits de transformation, l'essai peut être réalisé à des concentrations plus élevées. Il convient toutefois d'éviter les concentrations trop élevées, potentiellement toxiques pour les micro-organismes.

38. Le produit chimique d'essai doit être appliqué sous forme de solution aqueuse ou dissous dans un solvant organique approprié miscible à l'eau, et il convient de l'ajouter au lisier acclimaté, dans les différents récipients d'incubation, en le mélangeant avec soin tout en maintenant les conditions anaérobies. Pour cela, on recourra par exemple à un flux d'azote passant en continu sur les échantillons pendant l'application. Le volume de solution mère requis doit être pipeté dans le lisier sous agitation simultanée à l'aide de l'embout de

¹⁶ La mesure du potentiel redox peut être basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure en métal (platine, par exemple) et une électrode de référence (argent-chlorure d'argent, $Ag^+/AgCl$, par exemple). Le potentiel redox mesuré doit figurer dans le rapport sous la forme E_h , en référence à une électrode normale à hydrogène, avec le pH et la température de la matrice.

¹⁷ On tiendra compte du fait que les caractéristiques de sorption du lisier peuvent être altérées par la stérilisation.

la pipette, afin de répartir uniformément la solution dans le lisier. L'embout de la pipette reste ensuite dans le lisier¹⁸. D'autres méthodes d'application peuvent être utilisées (pipettes en verre, seringues microlitre, par exemple) si elles permettent une distribution homogène du produit chimique d'essai. Le volume total de solvant utilisé pour l'application ne doit pas excéder 1 % en volume.

11.5. Durée de l'essai et échantillonnage

39. La durée de l'essai dépendra de la vitesse de transformation du produit chimique parent et des produits de transformation. La durée standard de l'étude est de 90 jours après la fin de la période d'acclimatation. Elle a été établie à partir d'une enquête sur les durées classiques de stockage du lisier [28]. Dans certains cas, il peut être raisonnable de prolonger l'étude. Idéalement, à la fin de l'étude, le produit chimique d'essai et les produits de transformation devraient chacun être présents en quantités inférieures à 10 % de la quantité initialement appliquée.

40. À chaque échantillonnage sont sacrifiés au minimum les flacons d'incubation en duplicat. Les intervalles d'échantillonnage doivent être choisis de telle sorte qu'il soit possible d'établir le profil de disparition du produit chimique d'essai, ainsi que les profils de formation et de disparition des produits de transformation (par exemple 0, 1, 3, 7 jours ; 2, 3 semaines ; 1, 2, 3 mois, etc.). En plus de l'échantillonnage directement après l'application, au moins 7 moments d'échantillonnage doivent être prévus. Des moments d'échantillonnage supplémentaires peuvent être nécessaires pour la modélisation cinétique, et pour couvrir la formation et la disparition des produits de transformation. Un essai préliminaire peut fournir des indications utiles sur le comportement du produit chimique d'essai et des produits de transformation. Dans certains cas, une dissipation rapide du produit chimique d'essai peut être observée et les moments d'échantillonnage doivent être ajustés en conséquence.

41. Le CO₂ et le CH₄ sont des produits de transformation volatils susceptibles de se former en conditions anaérobies. Outre ces composés, d'autres produits volatils (acides gras volatils, notamment) peuvent également se former. L'essai doit être configuré de telle sorte que les conditions suivantes soient réunies :

- capture quantitative permettant d'éviter toute perte de composés volatils et d'établir un bilan massique,
- différenciation entre le CO₂ / le CH₄ et les autres composés volatils formés.

42. À cet effet, les pièges destinés à la mesure de la minéralisation sont retirés au minimum aux moments d'échantillonnage et analysés afin de déterminer le ¹⁴CO₂ et les autres gaz émis, respectivement. Dans un premier temps, les pièges à absorption sont retirés, remplacés par des pièges fraîchement remplis, et analysés pour déterminer la teneur en radioactivité. Puis les flacons d'incubation du lisier dont le retrait est prévu à ce même moment d'échantillonnage sont traités par addition de 10 mL de HCl à 10 %, afin de récupérer le CO₂ (ou HCO₃⁻ / CO₃²⁻) potentiellement dissous. Après addition de 10 mL de HCl à 10 %, les flacons d'incubation sont refermés et placés sous flux d'azote pendant au moins 24 heures. Puis les flacons d'incubation du lisier sont retirés et les échantillons sont soumis aux procédures de purification et d'extraction et aux analyses. Les pièges à CO₂ installés juste avant l'acidification sont retirés et il est procédé au radiocomptage afin de déterminer le ¹⁴CO₂ piégé en complément. Dans le cas où le produit chimique d'essai ou

¹⁸ Pour éviter les pertes, du lisier pouvant adhérer à l'embout.

les produits de transformation ne sont pas connus pour être stables en conditions d'acidification, des flacons d'incubation distincts doivent être ajoutés pour l'analyse chimique.

43. Pour la description détaillée des procédures d'échantillonnage, voir l'annexe 3 (système semi-statique) et l'annexe 4 (système dynamique).

12. Mode opératoire

12.1. Bilan massique, taux de récupération, répétabilité et sensibilité de la méthode analytique

44. Que les produits chimiques d'essai soient marqués ou non, le taux de récupération et d'autres critères de qualité (tels que la répétabilité) de la méthode d'analyse spécifique du produit chimique d'essai doivent être déterminés, selon [18] par exemple, et se situer au minimum entre 70 % et 110 %. Ces critères s'appliquent également aux méthodes d'analyse des produits de transformation. Pour les produits chimiques d'essai radiomarqués, le bilan massique initial doit se situer entre 90 % et 110 % et le bilan massique de chaque réplicat doit être compris au cours de l'essai entre 85 % et 115 % (voir aussi les critères de validité du paragraphe 13).

45. La limite de détection (LD) de la méthode d'analyse du produit chimique d'essai et des produits de transformation doit être inférieure ou égale à 1 % de la dose appliquée ou à 0.01 mg/kg de poids humide, selon celle de ces deux valeurs qui est la plus basse. La limite de quantification (LQ) doit également être spécifiée.

12.2. Mesures et analyse

46. L'extraction est pratiquée directement après le prélèvement des échantillons de lisier, à moins qu'il ait été établi que le stockage des échantillons n'a pas d'incidence sur le rendement d'extraction et la détermination analytique, cette démonstration figurant par exemple dans le rapport de validation de la méthode analytique. Pour l'extraction, il convient d'utiliser des solvants appropriés. La démarche adoptée doit permettre une récupération optimale de la substance parente et des produits de transformation. Des mélanges de solvants aqueux et des systèmes acide-base seront utilisés comme solvants pour l'extraction des produits parents et des produits de transformation de polarité élevée. Des méthodes d'extraction exhaustive sont préconisées. Ce sont notamment l'extraction par liquide sous pression (ASE[®], PLE, par exemple), par reflux, au Soxhlet, etc., avec des solvants appropriés. Lorsque le produit chimique d'essai est marqué au ¹⁴C, les résidus restant après extraction exhaustive (résidus non extractibles, RNE¹⁹) doivent être quantifiés par combustion et un bilan massique doit être calculé pour chaque intervalle d'échantillonnage. Les analytes ne doivent pas être altérés par les différentes méthodes d'extraction. Cela peut être démontré au moyen de témoins appropriés pour les substances connues. Les méthodes d'extraction utilisées doivent être décrites en détails dans le rapport d'essai.

¹⁹ Si la quantité de RNE ne peut pas être déterminée (dans une étude sans marquage, par exemple), le résultat de l'étude ne pourra être utilisé qu'à titre qualitatif, à des fins d'information sur les produits de transformation formés, par exemple.

47. La concentration du produit chimique d'essai et des produits de transformation²⁰ doit être déterminée et consignée dans le rapport pour chaque moment d'échantillonnage (voir aussi le paragraphe 48). En règle générale, les produits de transformation détectés à $\geq 10\%$ de la radioactivité appliquée à tous les moments d'échantillonnage doivent être identifiés. Les produits de transformation détectés une fois à $\geq 5\%$ de la radioactivité appliquée et dont la concentration augmente au cours de l'étude doivent également être identifiés.

48. L'identification se fait généralement soit par cochromatographie du produit de transformation avec des substances de référence connues en utilisant deux systèmes différents, soit par des techniques permettant une identification structurale positive (MS, NMR, etc.). Dans le cas de la cochromatographie, les techniques chromatographiques utilisant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents ne sont pas adaptées pour la vérification de l'identité des produits de transformation, car elles ne sont pas indépendantes. L'identification par cochromatographie doit faire appel à deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, tels que la chromatographie sur couche mince (TLC, *thin layer chromatography*) en phase inverse et en phase normale, ou la TLC et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*). Si la séparation chromatographique est de qualité appropriée, une confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est pas nécessaire. Une identification non ambiguë peut aussi être obtenue par des méthodes fournissant des informations structurales, telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, *gas chromatography/mass spectrometry*), la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, *liquid chromatography/mass spectrometry*), la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et la résonance magnétique nucléaire.

49. Il n'est généralement pas nécessaire d'établir la stéréochimie des produits de transformation, sauf si un comportement divergent est observé.

50. Des méthodes appropriées doivent être utilisées pour élucider la voie de transformation de façon aussi complète que possible.

51. Une attention particulière doit être accordée aux RNE, car le lisier est un compartiment de transition, c'est-à-dire que la matrice du lisier est elle-même dégradée après épandage au sol. Cela signifie que la substance parente ou les produits de transformation piégés dans la matrice ou associés à elle, et qui ne peuvent pas être extraits par les méthodes d'extraction exhaustive mentionnées plus haut, seront libérés selon toute probabilité par suite de la dégradation de la matrice du lisier²¹.

²⁰ Selon le cadre réglementaire applicable, les seuils ou les critères relatifs à l'identification des produits de transformation peuvent être différents. On veillera, lors de la planification de l'étude, à se référer aux données réglementaires pertinentes.

²¹ Des guides pour une caractérisation plus poussée et une classification des RNE sont en cours d'élaboration [29, 30]. En l'absence d'autres données expérimentales, les RNE pourraient être considérés comme des composés parents. Selon les cadres réglementaires, les concepts relatifs aux RNE pourraient être différents, en particulier pour ce qui est de la détermination analytique, des méthodes d'extraction spécifiques et de la classification des différents types de RNE, ou encore de l'utilisation des résultats aux fins d'évaluation des risques. On veillera, lors de la planification de l'étude, à se référer aux exigences réglementaires pertinentes.

12.3. Évaluation cinétique des résultats de l'essai

52. La qualité de l'ajustement d'un modèle cinétique approprié aux résultats de l'essai doit être évaluée conformément aux recommandations réglementaires applicables (guide FOCUS sur la cinétique [31], recommandations EPA, etc.). Des moments d'échantillonnage supplémentaires pourraient être nécessaires si les produits de transformation sont observés dans le but d'établir les valeurs de TD₅₀ et TD₉₀.

13. Résultats et rapport

13.1. Traitement et évaluation des résultats d'essai

52. Les valeurs des paramètres de la matrice de lisier doivent être consignées comme indiqué au tableau du paragraphe 25 (sur la base du poids humide, s'il y a lieu).

53. Les quantités de produit chimique d'essai, de produits de transformation, de substances volatiles, de CO₂ et CH₄, et de résidus non extractibles doivent être indiquées en % de la quantité initialement appliquée et, lorsqu'il y a lieu, en mg/kg de lisier (sur la base du poids humide) pour chaque intervalle d'échantillonnage. Un bilan massique doit être établi en pourcentage de la quantité initialement appliquée pour chaque intervalle d'échantillonnage. Les données doivent être rapportées séparément pour chaque réplicat, et sous forme de moyenne arithmétique de tous les réplicats (voir l'exemple de l'annexe 5). Une représentation graphique de la concentration du produit chimique d'essai et des produits de transformation en fonction du temps, sur une échelle non logarithmique, doit être jointe. Les principaux produits de transformation doivent être identifiés, et leurs concentrations doivent également être tracées en fonction du temps, afin d'illustrer leurs vitesses de formation et de disparition. Est considéré comme l'un des principaux produits de transformation tout produit représentant ≥ 10 % de la dose appliquée à tout moment au cours de l'étude. De plus, les produits de transformation détectés à ≥ 5 % de la radioactivité appliquée et dont la formation maximale n'a pas été atteinte à la fin de l'étude doivent également être identifiés (voir le paragraphe 47).

54. Les valeurs de TD₅₀ et TD₉₀ pour le produit chimique d'essai et pour chacun des produits de transformation doivent être déterminées lorsque c'est possible, en ajustant les données à l'aide d'un modèle cinétique approprié compte tenu des orientations dont on dispose. Les valeurs TD_x doivent être accompagnées d'une description du modèle utilisé, et d'une mesure de la qualité d'ajustement du modèle. La référence [31], en particulier, fournit des précisions pour ces calculs.

13.2. Rapport d'essai

55. Le rapport doit comporter les éléments suivants :

Produit chimique d'essai et produits de transformation (lorsqu'il y a lieu) :

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule développée (indiquant la position du/des marqueur(s) le cas échéant) et propriétés physicochimiques pertinentes,
- pureté (impuretés) du produit chimique d'essai,
- pureté radiochimique du produit chimique marqué et activité spécifique, certificat d'analyse (s'il y a lieu) ;

Substance(s) de référence pour l'identification des produits de transformation :

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

Déterminations analytiques :

- méthodes de détermination des paramètres de la matrice de lisier,
- méthodes de quantification et d'identification du produit chimique d'essai et des produits de transformation,
- résultats de la validation des méthodes analytiques, incluant entre autres le taux de récupération, la répétabilité, la LD et la LQ (exprimée en pourcentage de la quantité appliquée et en mg/kg) des méthodes utilisées (voir aussi [18]),
- bilan massique,
- description détaillée de la procédure d'extraction ;

Lisier soumis à l'essai :

- informations relatives au site de prélèvement (date, localisation, type et nombre d'animaux, alimentation, type et taille du réservoir de lisier, informations sur l'utilisation de produits chimiques tels que des biocides ou des médicaments vétérinaires dans les six mois précédant le prélèvement),
- date et procédure de prélèvement du lisier,
- paramètres de la matrice de lisier (pH, teneur en matière organique, teneur en azote, potentiel redox, teneur en matière sèche, température, poids humide ; voir aussi le tableau du paragraphe 25),
- durée et conditions de stockage du lisier (en cas de stockage dans le laboratoire) ;

Conditions de l'essai :

- dates de réalisation des études,
- quantité de produit chimique d'essai appliquée,
- calcul de la concentration maximale attendue dans le lisier (et justification),
- solvants utilisés (s'il y a lieu) et méthode d'application du produit chimique d'essai,
- poids de lisier traité (poids frais),
- description du système d'incubation utilisé,
- débits d'azote (pour les systèmes dynamiques et les systèmes semi-statiques uniquement),
- température,
- paramètres de la matrice de lisier (pH, potentiel redox, teneur en matière sèche, poids humide du lisier, température ; voir aussi le tableau du paragraphe 25),
- nombre de réplicats et nombre de témoins, y compris les témoins stériles ;

Résultats :

- résultats de la caractérisation de la matrice de lisier pour chaque moment d'échantillonnage,

- tableau des résultats, exprimés en mg/kg de lisier (sur la base du poids humide), fournis pour chaque réplicat et sous la forme de moyenne de tous les réplicats, pour les paramètres suivants (voir l'exemple de l'annexe 5) :
 - h caractérisation de la radioactivité non extractible,
 - i quantification des émissions de CO₂ et de CH₄, et d'autres composés volatils,
 - j bilan massique pour chaque moment d'échantillonnage,
 - k quantification spécifique par substance du produit chimique d'essai et des produits de transformation,
- tracés (non logarithmiques) des concentrations en fonction du temps pour le produit chimique d'essai et, s'il y a lieu, les principaux produits de transformation,
- valeurs de TD₅₀ et TD₉₀ pour le produit chimique d'essai et, s'il y a lieu, les principaux produits de transformation, accompagnées du modèle cinétique employé et de la procédure d'ajustement utilisée,
- transformation abiotique en conditions stériles,
- stabilité des substances au stockage, si les échantillons sont stockés avant l'analyse chimique,
- évaluation de la cinétique de transformation du produit chimique d'essai et, s'il y a lieu, des produits de transformation,
- voie de transformation proposée, avec formules développées et noms des produits de transformation correspondants tout au long du rapport,
- discussion et interprétation des résultats,
- données brutes (chromatogrammes, calculs des vitesses de transformation et méthodes utilisées pour identifier les produits de transformation, par exemple).

14. Bibliographie

1. Wohde M, Berkner S, Junker T, Konradi S, Schwarz L, Düring RA (2016) Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review. *Environ Sci Eur* 28:1-25.
2. Junker T, Römbke J, Hennecke D, Herrchen M, Düring RA, Thiele-Bruhn S, Meinerling M, Fiebig S, Topp E, Völkel W (2016). Harmonization of environmental exposure assessment for veterinary pharmaceuticals and biocides: ring test for validation of a draft test protocol for studies on transformation in manure. UBA-Texte 80/2016. 231 pages. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, Germany. Available from: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/harmonization-of-environmental-exposure-assessment-1>
3. Junker T, Atorf C, Berkner S, Düring R-A, Hennecke D, Herrchen M, Konradi S, Merrettig-Bruns U, Römbke J, Wagner J, Weinfurter K (2020). Development of a test method for transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in anaerobic liquid manure. *Environmental Sciences Europe* 32:39.

4. OECD (2002a). Test No. 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070509-en>.
5. OECD (2002b). Test No. 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070523-en>.
6. OECD (2019). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/0ed2f88e-en>.
7. Weinfurtner K. (2010). Matrix parameters and storage conditions of manure. UBA-Texte 02/2011, ISSN 1862-4804. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 1- 54, <http://www.uba.de/uba-info-medien-e/4054.html>
8. OECD (1995a). Test No. 105: Water Solubility, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069589-en>.
9. OECD (2006). Test No. 104: Vapour Pressure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069565-en>.
10. OECD (1995b). Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
11. OECD (2004). Test No. 111: Hydrolysis as a Function of pH, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069701-en>.
12. OECD (1981). Test No. 112: Dissociation Constants in Water, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069725-en>.
13. OECD (2000). Test No. 106: Adsorption -- Desorption Using a Batch Equilibrium Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069602-en>.
14. OECD (2010). Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070080-en>.
15. OECD (2000), Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070226-en>.
16. OECD (2000), Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070240-en>.
17. OECD (2007). Test No. 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria: Reduction of Gas Production from Anaerobically Digesting (sewage) Sludge, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264067332-en>.
18. OECD (2014). Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance used in Support of Pre-and-Post-

Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products. [ENV/JM/MONO\(2014\)20](#).

19. Hennecke D, Atorf C, Bickert C, Herrchen M, Hommen U, Klein M, Weinfurter K, Heusner E, Knacker T, Junker T, Römbke J, Merrettig-Bruns U (2015). Development of a test protocol to study the transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in liquid manure. UBA-Texte 78/2015. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, Germany, p 148. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte_78_2015_development_of_a_test_protocol_to_study_the_transformation.pdf
20. ISO (2021). ISO 10390: Soil, treated biowaste and sludge - Determination of pH. International Organization for Standardization, Geneva, 2021.
21. DIN (2001). DIN EN 12879:2001-02: Characterization of sludges - Determination of the loss on ignition of dry mass. Deutsches Institut für Normung, Berlin.
22. ISO (1995). ISO 11261: Soil quality - Determination of total nitrogen - Modified Kjeldahl method. International Organization for Standardization, Geneva, 1995.
23. ISO (1984). ISO 5664: Water quality - Determination of ammonium - Distillation and titration method. International Organization for Standardization, Geneva, 1984.
24. ISO (2002). ISO 11271: Soil quality - Determination of redox potential - Field method. International Organization for Standardization, Geneva, 2002.
25. DIN (1984). DIN 38404-6:1984-05: German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; physical and physico-chemical parameters (group C); determination of the oxidation reduction (redox) potential (C 6). Deutsches Institut für Normung, Berlin, May 1984.
26. DIN (2001). DIN EN 12880:2001-02: Characterization of sludges - Determination of dry residue and water content. Deutsches Institut für Normung, Berlin.
27. EFSA (2007). Opinion on a request from EFSA related to the default Q10 value used to describe the temperature effect on transformation rates of pesticides in soil. The EFSA Journal 622: 1-32.
28. VICH (2009). Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products. EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1.
29. Kaestner M, Trapp S, Schäffer A (2018). Consultancy services to support ECHA in improving the interpretation of Non-Extractable Residues (NER) in degradation assessment. Discussion paper - final report. https://echa.europa.eu/documents/10162/13630/echa_discussion_paper_en.pdf/4185cf64-8333-fad2-8ddb-85c09a560f7c
30. Loeffler D, Hatz A, Albrecht D, Fligg M, Hogeback J, Ternes TA (2020). Determination of non-extractable residues in soils: Towards a standardised approach. Environ Poll, 259, 113826, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113826>.
31. FOCUS (2014). Generic guidance for Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Version 1.1, 440 pp.

ANNEXE 1

Définitions

Bilan massique : pourcentage de la radioactivité appliquée, initialement introduite dans le système d'essai, qui est récupéré à chaque moment d'échantillonnage.

Essai dynamique : système d'incubation dans lequel le lisier est balayé en permanence par un flux d'azote saturé en eau.

Essai semi-statique : système d'incubation dans lequel les échantillons de lisier sont balayés par un flux d'azote humidifié au début de l'essai, puis par intermittence (une fois par semaine, par exemple) tout au long de l'essai.

Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) : la limite de détection est la concentration d'une substance au-dessous de laquelle l'identité de la substance ne peut pas être distinguée des artefacts analytiques. La limite de quantification est la concentration d'une substance au-dessous de laquelle la concentration ne peut pas être déterminée avec une exactitude acceptable.

Lisier : mélange d'urine, de fèces et d'eau collecté dans un réservoir de stockage, forte teneur en liquide, peut contenir des résidus de litière.

Minéralisation (en conditions anaérobies) : transformation complète d'un composé organique en CH₄, CO₂ et H₂O.

Produits de transformation : toutes les substances résultant des réactions de transformation biotique ou abiotique du produit chimique d'essai, y compris CO₂, CH₄ et les résidus non extractibles.

Résidus non extractibles (RNE) : représente les composants du lisier qui persistent dans la matrice après extraction.

Taux de récupération : rapport (en %) entre le produit chimique d'essai initialement introduit et le produit chimique d'essai récupéré après extraction.

TD₅₀ (temps de disparition ou de dissipation 50) : durée correspondant à une diminution de 50 % de la concentration initiale du produit chimique d'essai.

TD₉₀ (temps de disparition ou de dissipation 90) : durée correspondant à une diminution de 90 % de la concentration initiale du produit chimique d'essai.

Abréviations

AGV : acides gras volatils

ASE : extraction accélérée par solvant

GC : chromatographie en phase gazeuse

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HRMS : spectrométrie de masse à haute résolution

LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LD : limite de détection

LQ : limite de quantification

LSC : comptage des scintillations en milieu liquide

MS : spectrométrie de masse

MV : médicaments vétérinaires

NMR : spectrométrie par résonance magnétique nucléaire

PLE : extraction par liquide pressurisé

RAM : surveillance de la radioactivité

RNE : résidus non extractibles

TFA : acide trifluoroacétique

TLC : chromatographie sur couche mince

UVCB : substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

ANNEXE 2.

Échantillonnage et détermination analytique pour l'acide salicylique

En dehors de la procédure décrite ci-dessous, d'autres méthodes analytiques appropriées peuvent être utilisées (par ex. GC-MS ou LC-MS).

Un échantillon de lisier humide de 50 g est extrait une fois à l'aide d'une solution à 80 mL de méthanol + 1 % d'acide trifluoroacétique (TFA), puis deux fois à l'aide d'une solution à 50 mL de méthanol + 1 % de TFA. Pour l'extraction, les échantillons sont agités pendant 30 minutes sur un agitateur horizontal et centrifugés, par exemple pendant 10 minutes à 740 x g. Après centrifugation, l'extrait surnageant est recueilli et le culot est soumis à l'étape d'extraction suivante. L'ensemble du processus est répété deux fois. Les extraits sont combinés, puis analysés par radio-TLC. Après la dernière étape d'extraction, le culot est séché à l'air libre et des aliquotes sont soumises à une combustion et à un dosage radiologique afin de fournir des informations sur la quantité de résidus non extractibles (RNE).

En plus de l'extraction décrite, d'autres étapes d'extraction utilisant l'extraction accélérée par solvant (ASE®, PLE) peuvent être réalisées. Pour l'extraction accélérée par solvant (ASE®), c'est-à-dire l'extraction sous haute pression et à haute température (100 °C, 12 000 kPa, chauffage pendant 5 minutes, suivi d'un temps statique de 10 minutes), on utilise le même mélange de solvants que pour la première étape d'extraction (80 mL de méthanol + 1 % de TFA). L'extraction est effectuée deux fois mais les extraits ne sont pas combinés.

Comme les extraits non purifiés peuvent influencer les performances de la HPLC en produisant des pics larges, la radio-TLC est préférée à la HPLC. Le système de TLC suivant est suggéré :

- phase stationnaire : gel de silice KG60 ;
- phase mobile : méthanol / toluène / éthylacétate / acide acétique ; 10/44/43/3 (v/v/v/v).

Les pics de radioactivité obtenus après le développement des plaques de TLC sont caractérisés par leurs valeurs R_f ainsi que par leur attribution aux pics de l'acide salicylique cochromatographié et des éventuels produits de transformation.

Les valeurs R_f types sont les suivantes :

Acide salicylique :	R_f	=	0,50	–	0,55
Acide salicylurique :	R_f	=	0,31	–	0,36
Acide gentisinique :	R_f	=	0,42 – 0,47		

Si, en outre, on observe des pics qui ne peuvent être attribués à aucune des substances de référence utilisées, ils doivent être décrits par leurs valeurs R_f et nommés comme produits de transformation T1, T2, etc.

Pour déterminer la minéralisation en CO_2 et CH_4 , voir l'annexe 3.

Un bilan massique peut être établi en additionnant les quantités de radioactivité indiquées en [% de la radioactivité appliquée ; (% aR)] dans les extraits aqueux/organiques, le dioxyde de carbone ($^{14}\text{CO}_2$), le méthane ($^{14}\text{CH}_4$) et les résidus non extractibles (RNE) :

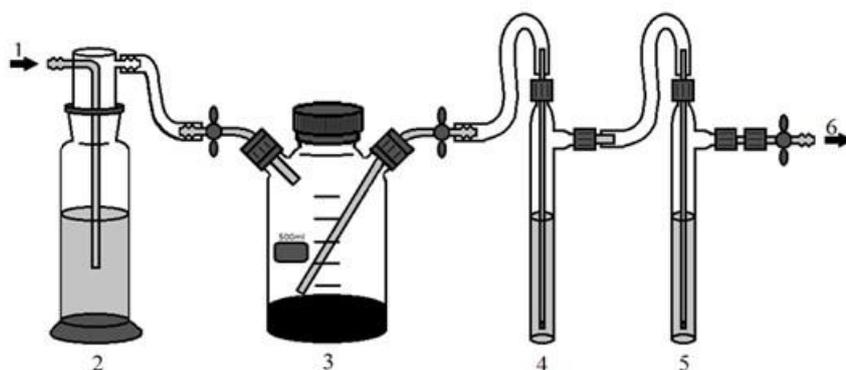
Bilan massique [% aR] = substances extractibles [% aR] + $^{14}\text{CO}_2$ [% aR] + $^{14}\text{CH}_4$ [% aR]
+ RNE [% aR].

ANNEXE 3.

Incubation dans un système semi-statique

Figure 1. Exemple d'appareil semi-statique

Incubation



- [1] entrée d'azote
- [2] barboteur à gaz contenant de l'eau déminéralisée
- [3] flacon d'incubation contenant du lisier
- [4] piège à CO₂ (contenant par ex. du NaOH 2 M)
- [5] piège à CO₂ (contenant par ex. du NaOH 2 M)
- [6] sortie

Les échantillons de lisier sont ajoutés au flacon d'incubation [3]. Le flacon est relié à un appareil semi-statique. Pendant 1 heure, le lisier est balayé par un léger flux d'azote humidifié afin d'éliminer l'air du système et d'assurer des conditions anaérobies. Après le balayage à l'azote humidifié, on clot le système en fermant les deux vannes directement situées sur le flacon d'incubation et la vanne à la sortie du second piège contenant du NaOH [5]. Selon le produit chimique d'essai et ses produits de transformation éventuels, d'autres pièges (par ex. éthylène glycol ou acide sulfurique) peuvent être nécessaires pour recueillir les composés organiques volatils.

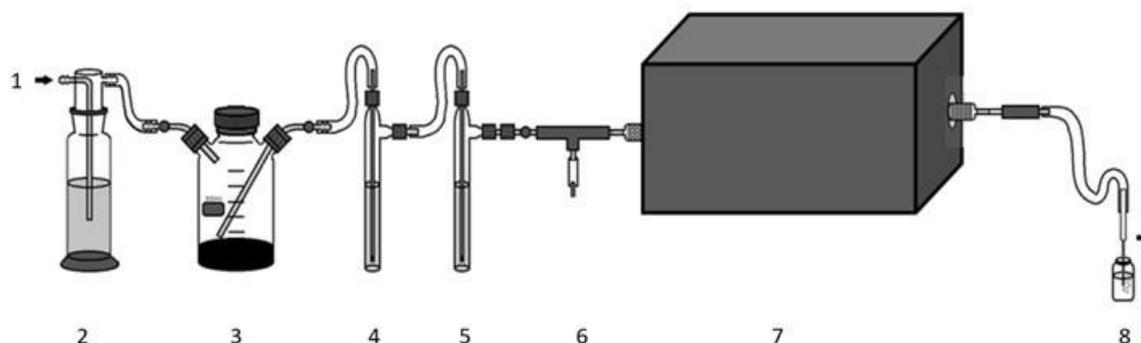
Note : La vanne à la sortie du flacon d'incubation peut être laissée ouverte pour augmenter l'espace libre du système semi-statique et permettre l'absorption du CO₂ émis dans le premier piège à CO₂ [4] pendant l'incubation. Dans ce cas, un piège de sécurité (barboteur vide) doit être inséré entre le flacon d'incubation [3] et le premier piège à CO₂ [4] afin d'éviter un retour de la solution absorbante dans le flacon d'incubation en cas de chute de pression dans le système d'essai.

À la fin de la période d'incubation, on raccorde les flacons d'incubation respectifs au dispositif dynamique décrit ci-dessous pour détecter le CO₂, le CH₄ et les AGV formés.

En raison de la formation de gaz dans le lisier, la pression dans le récipient d'essai fermé augmente pendant la période d'incubation. Afin d'éviter des pertes de composés volatils qui entraîneraient un bilan massique incomplet, les récipients d'essai doivent être raccordés

à l'appareil dynamique et purgés avec de l'azote humidifié à intervalles réguliers (par ex. une fois par semaine).

Figure 2. Détection du CO₂, du CH₄ et des AGV



- [1] entrée d'azote
- [2] barboteur à gaz contenant de l'eau déminéralisée
- [3] flacon d'incubation contenant du lisier
- [4] piège à CO₂ (contenant par ex. du NaOH 2 M)
- [5] piège à CO₂ (contenant par ex. du NaOH 2 M)
- [6] tube de dérivation pour une autre entrée d'air/oxygène contenant du gel de silice ou des granulés de chaux sodée
- [7] four avec tube en verre de quartz (rempli de CuO comme catalyseur) à 800 °C - 850 °C
- [8] piège à CO₂ (contenant par ex. du NaOH 2 M)

Différenciation entre le CO₂, le CH₄ et les AGV

On fait barboter de l'azote humidifié dans les échantillons de lisier à un débit d'environ 50 à 200 mL/min pendant au moins 1 heure. Le ¹⁴CO₂ émis est purgé des échantillons de lisier, transporté et capturé dans des pièges ([4] et [5]) contenant un absorbant de CO₂ (par ex. du NaOH 2 M). Si du ¹⁴CH₄ se forme, il passera à travers les pièges à CO₂ ([4] et [5]). Après l'ajout d'oxygène ou d'air ambiant [6], le ¹⁴CH₄ est soumis à une oxydation catalytique (= CuO) dans un four [7] à 800 °C - 850 °C pour former du ¹⁴CO₂. Le ¹⁴CO₂ formé est piégé dans le piège à CO₂ [8] situé à la sortie du four.

Ce type de dispositif permet de différencier le ¹⁴CO₂ émis (capturé dans les pièges [4] et [5]) du ¹⁴CH₄ (capturé dans le piège [8]). Selon le produit chimique d'essai et ses produits de transformation éventuels, d'autres pièges (par ex. éthylène glycol ou acide sulfurique) peuvent être nécessaires pour recueillir les composés organiques volatils.

Pour vérifier que la radioactivité capturée dans les pièges à CO₂ [4] et [5] est bien due au ¹⁴CO₂ et ne provient pas d'acides gras volatils (AGV), qui peuvent également se former, il est possible de procéder à une précipitation des éléments radioactifs par BaCl₂. On mesure la radioactivité dans les solutions de piégeage [4] et [5]. Ensuite, 20 ml de BaCl₂ 0,25 M sont ajoutés à des aliquotes de 10 ml des solutions de piégeage [4] et [5], respectivement. La précipitation du Ba¹⁴CO₂ se produit. On mesure alors de nouveau la radioactivité du surnageant. Le contenu radioactif dans le surnageant après précipitation peut être attribué aux AGV, tandis que la différence entre le contenu radioactif avant précipitation et le contenu radioactif après précipitation peut être attribuée au ¹⁴CO₂ émis.

Quantification des composés volatils

La quantification des composés volatils piégés s'effectue par comptage radioactif (comptage des scintillations en milieu liquide, LSC) d'aliquotes des solutions de piégeage.

En particulier lors de l'utilisation d'un dispositif semi-statique, il est important d'acidifier les échantillons pour libérer le CO₂ piégé, en ajoutant 10 ml de HCl à 10 %, puis en procédant à une nouvelle incubation et au piégeage du CO₂ supplémentaire libéré.

Ceci peut être réalisé comme suit : après avoir fait barboter de l'azote humidifié dans les échantillons de lisier pendant au moins 1 heure, on retire les pièges à CO₂ ([4] et [5]) et on les analyse pour mesurer le ¹⁴CO₂ piégé et les autres gaz émis, respectivement, comme décrit ci-dessus. Les pièges retirés sont remplacés par des pièges fraîchement remplis.

Ensuite, les flacons d'incubation de lisier à retirer à ce point d'échantillonnage particulier sont additionnés de 10 mL de HCl à 10 % afin d'éliminer le CO₂ (ou le HCO₃⁻ / CO₃²⁻) potentiellement dissous. Après l'ajout des 10 ml de HCl à 10 %, les flacons d'incubation sont refermés et on fait barboter de l'azote humidifié dans le lisier pendant au moins 24 heures²². Les échantillons ne sont pas remués afin d'éviter la formation de mousse. Si de la mousse est néanmoins observée, l'acide doit être ajouté lentement (par ex. goutte à goutte) tout au long de la période d'incubation. Ensuite, les flacons d'incubation de lisier sont retirés et le lisier est purifié et extrait. Les pièges à CO₂ sont également retirés et on procède au comptage radioactif du CO₂ supplémentaire piégé.

Note : Avant d'ajouter 10 % de HCl au lisier, il convient de vérifier si le produit chimique d'essai et les produits de transformation sont stables dans des conditions acides²³. Si ce n'est pas le cas, d'autres répliqués doivent être incubés à cette fin.

22 Le temps nécessaire pour purger complètement le ¹⁴CO₂ des pièges à CO₂ dépend fortement de la quantité de ¹⁴CO₂ formé ainsi que de la rapidité de cette formation de ¹⁴CO₂. Pour les produits chimiques d'essai à forte minéralisation, il est recommandé de purger pendant au moins 24 heures, mais des périodes allant jusqu'à plusieurs jours peuvent être nécessaires pour piéger la totalité du ¹⁴CO₂. Si l'on s'attend à une minéralisation élevée, la purge optimale peut être déterminée lors d'études préliminaires.

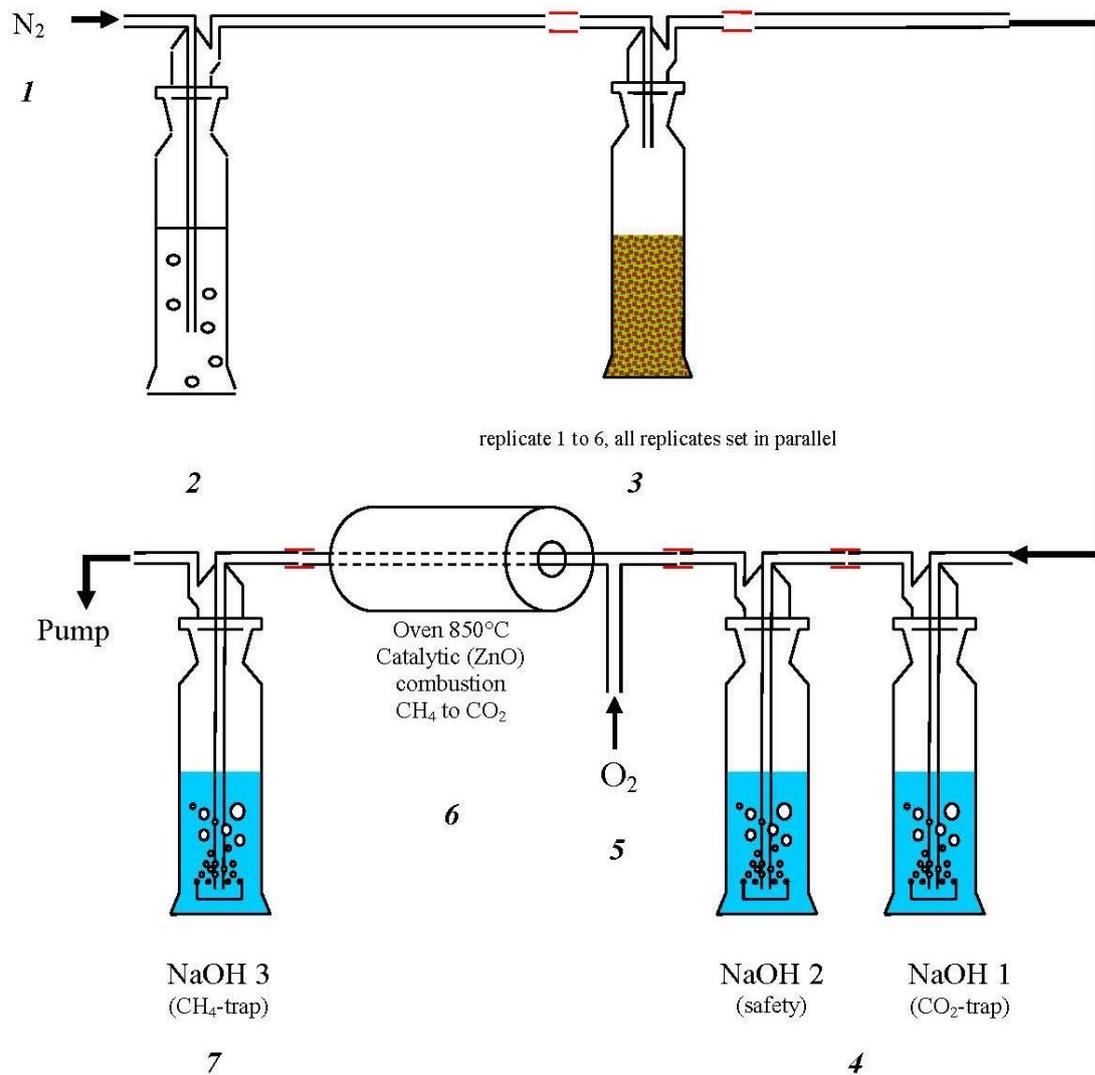
23 Dans le cas de produits de transformation inconnus, la vérification de la stabilité n'est pas possible. Un essai préliminaire peut être effectué pour identifier les produits de transformation attendus.

ANNEXE 4.

Incubation dans un système dynamique

Figure 3. Exemple d'appareil dynamique

Incubation



- [1] circulation d'un léger flux d'azote dans les sous-échantillons de lisier
- [2] barboteur à gaz contenant de l'eau
- [3] flacons de transformation du lisier remplis avec au moins 50 – 100 g de lisier (poids frais)
- [4] pour la transformation anaérobie, juxtaposition nécessaire de deux pièges contenant du NaOH pour piéger le CO₂ émis
- [5] ajout d'oxygène ou d'air ambiant pour la combustion catalytique ultérieure du CH₄
- [6] four pour la combustion du CH₄ en CO₂
- [7] piège contenant du NaOH pour le CO₂ formé à partir du CH₄

Différenciation entre le CO₂, le CH₄ et les AGV

On fait circuler de l'azote humidifié dans les sous-échantillons de lisier à un débit d'environ 50 à 200 mL/min. Sous l'effet de ce flux constant de N₂, le ¹⁴CO₂ émis est purgé des échantillons de lisier, transporté et capturé dans les pièges 1 (piège à CO₂) et 2 (piège de sécurité) contenant un absorbeur de CO₂ (par ex. du NaOH 2 M). Le ¹⁴CH₄ éventuellement formé passe dans les pièges à CO₂. Après l'ajout d'oxygène, le ¹⁴CH₄ est soumis à une oxydation catalytique (= CuO) dans un four à 800 °C - 850 °C pour former du ¹⁴CO₂. Le ¹⁴CO₂ formé est piégé dans le piège à CO₂ (piège 3) situé à la sortie du four.

Ce type de dispositif permet de différencier le ¹⁴CO₂ émis (capturé dans les pièges 1 et 2) du ¹⁴CH₄ (capturé dans le piège 3). Selon le produit chimique d'essai et ses produits de transformation éventuels, d'autres pièges (par ex. éthylène glycol ou acide sulfurique) peuvent être nécessaires pour recueillir les composés organiques volatils.

Pour vérifier que la radioactivité capturée dans les pièges à CO₂ 1 et 2 est bien due au ¹⁴CO₂ et ne provient pas d'acides gras volatils (AGV), qui peuvent également se former, il est possible de procéder à une précipitation des éléments radioactifs par BaCl₂. On mesure la radioactivité dans les solutions de piégeage 1 et 2. Ensuite, 20 mL de BaCl₂ 0,25 M sont ajoutés à des aliquotes de 10 mL des solutions de piégeage 1 et 2, respectivement. La précipitation du Ba¹⁴CO₂ se produit. On mesure alors de nouveau la radioactivité du surnageant. Le contenu radioactif dans le surnageant après précipitation peut être attribué aux AGV, tandis que la différence entre le contenu radioactif avant précipitation et le contenu radioactif après précipitation peut être attribuée au ¹⁴CO₂ émis.

Quantification des composés volatils

La quantification des composés volatils piégés s'effectue par comptage radioactif (comptage des scintillations en milieu liquide, LSC) d'aliquotes des solutions de piégeage.

En outre, il faut prouver que le ¹⁴CO₂ émis est bien purgé quantitativement lors du passage de l'azote humidifié dans les échantillons de lisier. Cela peut être vérifié en ajoutant du HCl aux sous-échantillons de lisier afin d'éliminer le CO₂ (ou le HCO₃⁻ / CO₃²⁻) potentiellement dissous dans la matrice du lisier. La purge par ajout de HCl doit être effectuée dans le cas où la quantité de ¹⁴CO₂ dépasse un niveau de 10 % de la radioactivité totale retrouvée (TRR, *total recovered radioactivity*).

Ceci peut être réalisé comme suit : on retire les pièges à CO₂ 1 et 2 au point d'échantillonnage particulier et on les analyse pour mesurer le ¹⁴CO₂ piégé et les autres gaz émis, respectivement, comme décrit ci-dessus. Les pièges retirés sont remplacés par des pièges fraîchement remplis.

Ensuite, les flacons d'incubation de lisier à retirer à ce point d'échantillonnage particulier sont additionnés de 10 mL de HCl à 10 % afin d'éliminer le CO₂ (ou le HCO₃⁻ / CO₃²⁻) potentiellement dissous. Après l'ajout des 10 mL de HCl à 10 %, les flacons d'incubation sont refermés et on fait circuler de l'azote pendant 24 heures. Les échantillons ne sont pas remués afin d'éviter la formation de mousse. Si de la mousse est néanmoins observée, l'acide doit être ajouté lentement (par ex. goutte à goutte) tout au long de la période d'incubation. Ensuite, les flacons d'incubation de lisier sont retirés et le lisier est purifié et extrait. Les pièges à CO₂ sont également retirés et on procède au comptage radioactif du CO₂ supplémentaire piégé. Afin d'éviter les interférences et les contaminations croisées avec les gaz émis, l'échantillonnage doit commencer par les échantillons situés près de la sortie.

Note : Avant d'ajouter 10 % de HCl aux sous-échantillons de lisier, il convient de vérifier si le produit chimique d'essai et les produits de transformation sont stables dans des conditions acides²⁴. Si ce n'est pas le cas, d'autres réplicats doivent être incubés.

²⁴ Dans le cas de produits de transformation inconnus, la vérification de la stabilité n'est pas possible. Un essai préliminaire peut être effectué pour identifier les produits de transformation attendus.

1

ANNEXE 5.

2 Schéma de présentation des résultats

3 Tableau A5 : Exemple de schéma de présentation – distribution de la radioactivité mesurée au cours d’une étude de transformation anaérobie dans le
4 lisier [% aR]

Temps [j]	Radioactivité mesurée [% aR]														
	Produit parent			Produit de transformation			Minéralisation (CO ₂ + CH ₄)			RNE			Bilan massique		
	R1	R2	Moyenn e	R1	R2	Moyenn e	R1	R2	Moyenn e	R1	R2	Moyenn e	R1	R2	Moyenn e
0	91.0	97.0	94.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	91.0	97.0	94.0
2	80.0	82.0	81.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	80.0	82.0	81.0
5	75.0	76.0	75.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23.1	21.9	22.5	98.1	97.9	98.0
10	67.0	66.0	66.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	25.2	24.7	25.0	92.2	90.7	91.5
18	60.0	59.0	59.5	nq	nq	nd	nd	nd	nd	36.7	33.3	35.0	96.7	92.3	94.5
27	53.0	55.0	54.0	nq	nd	nq	nd	nd	nd	45.3	42.7	44.0	98.3	97.7	98.0
35	49.0	51.0	50.0	2.2	1.3	1.8	nd	nd	nd	36.7	33.9	35.3	87.9	86.2	87.1
50	38.0	40.0	39.0	5.7	6.0	5.9	nd	nd	nd	53.4	52.3	52.9	97.1	98.3	97.7
65	33.0	34.0	33.5	10.8	9.7	10.3	nd	nd	nd	47.5	45.9	46.7	91.3	89.6	90.5
78	29.0	33.0	31.0	12.5	15.7	14.1	nd	nd	nd	46.9	47.1	47.0	88.4	95.8	92.1

90	34.0	30.0	32.0	9.4	8.5	9.0	nd	nd	nd	44.9	43.7	44.3	88.3	82.2	85.3
LD	0.3 %			0.5 %			0.3 %			0.5 %			-		
LQ	0.5 %			1.0 %			0.5 %			1.0 %			-		

5 R1 = répliat 1, R2 = répliat 2, Moyenne = moyenne de R1 et R2, nd = non détecté (< LD, limite de détection), nq = non quantifié (< LQ, limite de quantification)

6

7

ANNEXE 6.

Variabilité des paramètres des matrices de lisier et des valeurs de TD50

Paramètres des matrices de lisier

Les paramètres des matrices de lisier présentent une moins grande variabilité que ceux d'autres matrices environnementales telles que les sols ou les sédiments. D'après les résultats obtenus lors du développement et de la validation de la méthode, la dispersion des paramètres de la matrice est faible, bien que l'on ait choisi des lisiers aussi divers que possible [3].

Lisier de bovins :	Matière sèche : 9.9 ± 2.2 %	[3]
C _{org} :	4.1 ± 0.9 %	[3]
pH _{hiver} :	7.3 ± 0.4	[19]
pH _{été} :	6.9 ± 0.2	[19]
Lisier de porcs :	Matière sèche : 5.2 ± 3.2 %	[3]
C _{org} :	2.1 ± 1.3 %	[3]
pH :	7.3 ± 0.1	[19]

Valeurs de TD₅₀

La variabilité des valeurs de TD₅₀ entre différents sols (exprimée par le coefficient de variation CV) a été estimée à près de 100 % par FOCUS (2000). Les données sur les lisiers obtenues lors du développement de la méthode, des études de validation et d'études à caractère réglementaire présentaient un CV de 38 % en moyenne.

	Variabilité différents sols	Variabilité différents lisiers
CV (FOCUS 2000)	100 %	-
CV (moyenne ; études disponibles)	89 % (n = 43)*	37 % (n = 9)**
CV (dispersion selon études disponibles)	7 % -600 % (n = 43)*	20-57 % (n = 9)**
CV (moyenne ; comparaison directe pour l'éprinomectine ; même laboratoire, même substance (EMA 2018))	109 % (n = 4)	57 % (n = 5)

* Données provenant de l'évaluation de 43 études à caractère réglementaire

** Données provenant du développement de la méthode [19], des études de validation [2] et d'une demande d'autorisation de mise sur le marché (EMA 2018)

Les données disponibles montrent une moins grande variabilité des paramètres de la matrice et des valeurs de TD₅₀ pour le lisier que pour les sols.

Références complémentaires

EMA (2018). Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) - Final CVMP assessment report for LONGRANGE (EMEA/V/C/004291/0000).

Available at: https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/longrange-epar-refusal-public-assessment-report_en.pdf

FOCUS (2000). FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances - The report of the work of the Groundwater Scenarios Workgroup of FOCUS (FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their USE), Version 1 of November 2000. EC Document Reference Sanco/321/2000 rev.2, 202pp. Available at: <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/ground-water>.

Pour toutes les autres références, voir la section Bibliographie du texte principal de la ligne directrice.