



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Essai n° 218:
Essai de toxicité sur les chironomes dans
un système eau-sédiment chargé

4 juillet 2023

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



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

Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est conçue pour évaluer les effets d'une exposition sur des larves de *Chironomus* sp. à des substances chimiques, un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus dilutus* (précédemment connue comme *C. tentans*), mis au point en Europe (1)(2)(3) et en Amérique du Nord (4)(5)(6)(7)(8), et soumis à des essais tournants (1)(6)(9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Le mode d'exposition appliqué dans cette Ligne directrice consiste à mélanger la substance d'essai au sédiment. La sélection du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le chargement du sédiment vise à simuler l'accumulation de produits chimiques persistants dans le sédiment. Ce chargement s'effectue dans un système expérimental eau-sédiment.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition (c.à.d. l'eau, les sédiments et l'alimentation) et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente Ligne directrice est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. dilutus*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif

précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des expériences identiques, rajoutées au dispositif expérimental, peuvent être retirées après 10 jours d'essai.

4. Les effets observés sont basés sur les variables biologiques suivantes : le nombre de mâles émergés, le nombre de femelles émergées (donc aussi le nombre total d'adultes émergés) ainsi que le temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, la survie et la croissance des larves peuvent être mesurées après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire d'expériences identiques.

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué (aussi appelé sédiment formulé, artificiel ou synthétique) est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels :

- la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible ; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués ;
- les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène ; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques ;
- les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.

6. L'Annexe 1 contient les définitions employées dans la présente Ligne directrice.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. Une fois la substance d'essai incorporée au sédiment, des larves au premier stade sont introduites dans des béciers où les concentrations d'eau et de sédiment ont été stabilisées. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x% de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE10, CE50, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière nécessite une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques. Selon les exigences du cadre réglementaire en question, la conception de l'essai peut être optimisée pour estimer une CEx sur un effet spécifique et/ou déterminer une CSEO/CMEO (voir la section CONCEPTION DE L'ESSAI).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, ses coefficients de partage octanol-eau et dans le sédiment, mesurés ou calculés, et sa stabilité dans l'eau et

le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, dans l'eau des pores et dans le sédiment, et pour laquelle la précision et les seuils de détection et de quantification sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple sa dissipation, sa dégradation abiotique et biotique, etc.). Le document guide (12) propose des informations pour les substances avec lesquelles les essais sont rendus difficiles du fait de leurs propriétés physico-chimiques.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence doivent être testées régulièrement afin de démontrer, le cas échéant, la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais tournants et des études de validation : lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies :

- l'émergence dans chacun des réplicats chez les témoins doit atteindre au moins 70% à la fin de l'essai (1)(6) ; les données devront être consignées pour chaque réplicat (voir paragraphe 54) ;
- S'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux ; *C. dilutus* réclame une période de 20 à 65 jours ;
- Tout au long de l'essai, la concentration d'oxygène dissous devrait atteindre au moins 60% de sa valeur dans l'air saturé (VAS) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9;
- Tout au long de l'essai, la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béciers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent à l'eau sus-jacente et au sédiment d'atteindre une profondeur suffisante. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon ou du polytétrafluoroéthylène (PTFE)).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus dilutus* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'Annexe 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture d'autres espèces : *Chironomus dilutus* (4) (14) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification de l'espèce est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes ont été cultivés sur place.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué. Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique ; en outre il est recommandé de déterminer d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai (conditionnement). Nous recommandons le sédiment reconstitué comme décrit ci-dessous, d'après le sol artificiel utilisé dans la Ligne directrice 207 (14)(1)(15)(16) :

- a. 4-5% (poids sec) de tourbe (p.ex. Sphagnum), avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0 ; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules : S 1 mm) et séchée uniquement à l'air ;
- b. 20% (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30%) ;
- c. 75-76% (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50% des particules mesurant entre 50 et 200 μm) ;
- d. ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du sédiment atteigne 30 à 50% ;
- e. ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à $7,0 \pm 0,5$. Il faudrait obtenir 2% ($\pm 0,5\%$) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et en (c).

14. Les sources de tourbe, de kaolin et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, des composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'Annexe 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

15. Le type de sédiment et les ses propriétés peuvent affecter de manière substantielle le devenir et la biodisponibilité de la substance chimique testée, et par conséquent l'absorption par l'organisme d'essai et la toxicité. Dans le cas où un sédiment naturel est utilisé, il est impératif que les caractéristiques du sédiment qui peuvent avoir une influence sur la biodisponibilité et donc la toxicité soient reportées. Le carbone organique total fournit normalement la phase de liaison principale pour de nombreux produits

chimiques et donc sa concentration dans le sédiment naturel doit être mesurée afin de normaliser les données de toxicité par rapport au carbone organique total (18) (19) (voir paragraphe 45).

Eau

16. L'eau reconstituée doit être utilisée de préférence. Cependant, toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux Annexes 2 et 4 peut servir à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir Annexe 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau de culture et eau d'essai, si les chironomes y survivent sur toute la durée de la culture et de l'essai sans manifester de signes de stress (p. ex. une attitude inhabituelle). Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en CaCO₃. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'Annexe 4 sont à mesurer au moins deux fois par an, si une eau courante est utilisée, ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées. Si une eau courante est utilisée, une attention particulière devra être portée sur les caractéristiques mentionnées plus haut.

Solutions mères – sédiments chargés

17. On prépare généralement les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance d'essai au sédiment. Une solution mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un laminoin, d'un mélangeur d'aliments ou mélangée à la main. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, le recours à l'utilisation d'un solvant organique peut être nécessaire, c.à.d. il sera nécessaire de produire une solution mère suffisamment concentrée. Dans ce cas, le Document Guide No. 23 (12) devra être suivi. Des exemples de solvant organique adéquat sont l'hexane, acétone ou chloroforme. Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient expérimental. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à ce qu'il soit totalement éliminé du sable ; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment par béccher expérimental. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de la substance d'essai et du sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

CONCEPTION DE L'ESSAI

18. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer la CE ponctuelle, la CSEO et mener un essai limite est décrite.

Conduite d'une analyse de régression

19. La gamme de concentrations et la concentration efficace (par exemple, CE10, CE50) auxquelles la substance d'essai produit un effet intéressant doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dehors des concentrations testées. Il est utile de conduire un essai préliminaire pour déterminer la gamme des concentrations à utiliser (voir paragraphe 28).

20. S'il faut estimer la CE_x, au moins cinq concentrations et trois expériences identiques par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre d'expériences identiques par traitement peut être diminué dans certains cas ; cela est notamment possible quand le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets attendus est largement augmenté. L'augmentation du nombre d'expériences identiques ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre d'expériences identiques sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

21. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, on mettra à l'essai cinq concentrations expérimentales et au moins quatre expériences identiques par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20% avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5% ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (21)(22)(23). S'agissant des données sur l'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être utilisés. De façon alternative, le test de CPFISH (closure principle and Fisher-Freeman-Halton) peut être utilisé puisque ce test a une puissance statistique élevée (24).

Essai limite

22. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite se pratique avec une concentration suffisamment élevée pour permettre aux décideurs d'exclure tout effet toxique possible de la substance et la limite est fixée à une concentration censée ne jamais être atteinte dans les conditions réelles. Une concentration de 1000 mg/kg (poids de sédiment) est recommandée. Il est généralement nécessaire de mener au moins six expériences identiques pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour détecter une différence de 20% avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5% ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes).

On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher convient.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système sédiment chargé-eau

23. On dépose les sédiments chargés au fond des récipients avant d'y verser l'eau, de façon à obtenir un quotient volumique sédiment-eau de 1/4 (voir paragraphes 11 et 15). La profondeur de la couche de sédiment doit être de 1.5 cm. Le poids des sédiments ajoutés à chaque récipient d'essai (ou au moins les récipients d'essai utilisés pour la vérification analytique) doivent être enregistrés. Cette information est nécessaire afin de calculer le bilan massique. Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la re-suspension des particules fines pendant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque (fait de p. ex. d'acier inoxydable ou de PTFE) durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs conviennent également.

24. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre avec ouverture pour les tubages d'air, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Stabilisation

25. Une fois que le sédiment chargé surmonté d'une couche d'eau a été préparé, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (3)(4)(6)(13), et ce, de préférence, dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. L'équilibre met de quelques heures à quelques jours à s'établir et dépend du sédiment et de la substance chimique testée. Les substances organiques ayant un $Kow < 4$ peuvent atteindre l'équilibre après 1 à 2 semaines, tandis que les substances organiques de $Kow > 6$ peuvent prendre 2 mois ou plus pour atteindre l'équilibre (14). Les métaux peuvent atteindre l'équilibre après quelques semaines à quelques mois, mais la durée est fonction du métal et du sédiment (14). Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint, car beaucoup de substances risquent de se dégrader durant cette période, mais un temps de stabilisation de 48 heures est recommandé. Une période de stabilisation ou d'équilibration étendue peut être considérée et justifiée au cas par cas. La concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, les pores et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et la plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance d'essai permettent de calculer le bilan massique (25) et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées (p. ex. (26)).

Introduction des organismes d'expérience

26. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'expérience dans les récipients, des amas d'oeufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons garnis de milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou

quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir Annexe 2). Seuls des amas d'oeufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20°C et 1 à 4 jours pour *Chironomus dilutus* à 23°C et *Chironomus yoshimatsui* à 25°C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 jours après l'éclosion pour *C. riparius*, ou 1-4 jours après l'éclosion pour *C. dilutus* et *C. yoshimatsui*). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucheron d'après la largeur de la capsule de la tête (6).

27. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. La délicate aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant p.ex. 4 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 32). Selon le protocole expérimental principal suivi (voir paragraphes 20 et 21), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation de la concentration efficace (CE) ponctuelle et à 80 pour la détermination de la CSEO.

Concentrations expérimentales

28. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire. La densité larvaire par récipient expérimental doit être la même pour le test définitif. Pour le test définitif, au moins 5 niveaux de concentrations devront être utilisés et sélectionnés tel qu'indiqué aux paragraphes 19 à 21.

Témoins

29. L'essai inclura le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 20-21). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 17), on ajoutera un récipient témoin dont le sédiment renferme également le solvant, en plus du témoin seul (ou contrôle négatif). Il devrait correspondre 1a la concentration de solvant la plus élevée utilisée dans les niveaux de traitement et ne doit généralement pas excéder 0.01%.

Système expérimental

30. On utilise des systèmes statiques. Si l'évaporation se produit pendant l'essai, le volume d'eau sus-jacente doit être régulièrement ajusté par ajout d'eau distillée ou désionisée. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous ou la concentration des excréta dépasse les limites respectives, ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement moulue, par exemple Tetra-Min® ou Tetra-Phyll® ; voir les détails à l'Annexe 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées : 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. Les moucheron ne se nourrissent pas quand ils atteignent le stade de pupes, donc le régime alimentaire doit être adapté au nombre de larves qui ont atteint le stade de pupes et/ou ont émergé afin d'éviter des niveaux bas d'oxygène dissous. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à gérer, l'essai est à recommencer. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être ajoutée au sédiment reconstitué avant application de la substance d'essai et la phase de stabilisation (ou même l'équilibration). Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5% (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioeica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), par exemple, ou d'un autre matériau végétal (paille de blé séché et réduit en poussière) peut être utilisé (27). Dans l'alternative, des sédiments collectés à l'extérieur comprenant un niveau nutritionnel suffisant pour la durée totale de l'essai peuvent être utilisés en remplacement du sédiment OCDE standardisé, pour autant que les chironomes survivent à l'intérieur pour la durée de l'essai sans montrer de signes de stress (p. ex. migration des larves vers la colonne d'eau ou autre attitude inhabituelle).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60% de sa valeur dans l'air saturé). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour *C. riparius*. For *C. dilutus* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23°C et $25^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$. Si le test est conduit dans une salle isotherme, la température ambiante doit être vérifiée à des intervalles de temps appropriés (au moins une fois par jour). La photopériode est de 16 heures et l'éclairage compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale de l'exposition s'élève à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et à 65 jours pour *C. dilutus*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

Observations*Émergence*

35. Le nombre de mâles totalement émergés, le nombre de femelles totalement émergées ainsi que le nombre total de moucheron adultes totalement émergés sont à déterminer et enregistrer de façon quotidienne. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses. Le taux de développement respectif sont à calculer selon les paragraphes 52 et 53.

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, on comptera le nombre de moucheron émergés et on consignera le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Après identification, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'oeufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront ajoutés dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires sera tamisé à travers des mailles de 250 µm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères : l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule de la tête de chaque individu.

Mesures analytiques*Concentration de la substance d'essai*

38. Afin de déterminer analytiquement la concentration de la substance d'essai, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau des pores, et du sédiment, devront être prélevés pour l'analyse au début (avant l'introduction de larves voir paragraphe 25) et à la fin de l'essai, et ce au moins dans la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, mais de préférence dans toutes les concentrations testées dans au moins un des répliqués par niveau de traitement. Les concentrations de la substance d'essai nous renseignent sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment.

39. Si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental (p. ex. parce que des échantillons sont pris à des moments différents de l'essai), les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'expérience), mais non utilisés pour des observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger les échantillons p. ex. à 10 000 g et à 4°C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau des pores soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous et la température devront être mesurés au minimum dans un récipient de chaque niveau de traitement et un récipient des témoins au début de l'exposition et une fois par semaine en semaine 2 et semaine 3 de l'exposition, et dans tous les récipients désignés pour la détermination des variables biologiques à la fin de la période d'essai. La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement, le nombre total de moucheron mâles totalement émergés, le nombre total de moucheron femelles totalement émergés ainsi que le nombre total de moucheron totalement émergés, ou dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau) χ^2 , par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Les concentrations produisant des effets devraient toujours être enregistrés en mg de substance testée/kg de sédiment sec. Il est recommandé d'enregistrer les calculs relatifs à l'équilibre massique (25) (voir Annexe 5) afin de collecter des informations sur le partage de la substance chimique d'essai dans les différents compartiments. Ceci est optionnel en fonction des exigences des différentes réglementations ; il est aussi particulièrement important pour les substances difficiles à tester (concentrations difficiles à maintenir dans le système d'essai). Les effets mesurés peuvent aussi être exprimés en mg de substance d'essai/L d'eau sus-jacente quand cela est pertinent.

44. Afin d'exprimer les effets mesurés en terme de concentrations nominales sur la base des sédiments secs, il devrait y avoir des preuves que la concentration de la substance d'essai a été maintenue de façon satisfaisante (c.à.d. entre 80% et 120% de la concentration nominale tout au long de la période de l'essai). Si les concentrations sont susceptibles de dévier de plus de 20%, toutes les concentrations testées devront être mesurées et des analyses plus fréquentes pourraient être effectuées. Pour le compartiment sédimentaire, les effets mesurés devront être exprimés selon la moyenne géométrique des concentrations mesurées ou selon une moyenne arithmétique pondérée par le temps quand les échantillons sont prélevés à deux ou plusieurs intervalles de temps inégaux (les calculs devront aussi considérer les mesures analytiques intermédiaires supplémentaires) selon les recommandations de l'Annexe 2 du Document Guide No. 23 (12) et les exemples de l'Annexe 6 de la Ligne directrice 211 de l'OCDE sur le test de reproduction de la daphnie (26). Concernant l'eau sus-jacente, les effets mesurés

devront être exprimés de façon similaire selon la moyenne géométrique des concentrations mesurées ou selon une moyenne arithmétique pondérée par le temps.

45. Afin de convertir les données de concentration exprimées p. ex. en mg/kg de sédiment sec en mg/kg de carbone organique (CO), la concentration de sédiment sec devra être divisée par le pourcentage de COT (carbone organique total, exprimé en nombre décimal), comme suit :

$$mg/kg \text{ CO} = \frac{mg/kg \text{ sédiment sec}}{kg \text{ CO}/kg \text{ sédiment sec}}$$

46. Pour estimer ponctuellement la CE10 et la CE50 ou une quelconque valeur de CEx, les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CEx, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient de transformer les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CEx sont à calculer après que les résultats ont été «détransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale. Des informations plus détaillées sur les statistiques sont fournies dans le Document de l'OCDE No. 54 sur les Approches actuelles dans l'analyse statistique des données d'écotoxicité : guide d'application (28).

47. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) « emboîtée ». Par contre, des tests plus robustes (29) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

48. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haentzal avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (30). Le test CPFISH (closure principle and Fisher-Freeman-Halton test (24)) peut également être utilisé pour évaluer les données d'émergence (voir paragraphe 21).

La somme des mouchérons émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où :

TE	=	taux d'émergence
n_e	=	nombre de mouchérons émergés par récipient
n_a	=	nombre de larves introduites par récipient

49. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de William si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de mouchérons émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.

50. Avant d'appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), il faut d'abord transformer les valeurs du TE par arcsinus-racine carrée ou selon Tukey-Freeman, afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus (sinus-1) de la racine carrée du TE.

51. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CEx sont calculées par une analyse de régression (ou par probit (30), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.). Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

52. La période de développement moyenne représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de mouchérons (pour calculer la période de développement réelle, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité : 1/jour) et représente la portion de développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement, car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CEx peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (31) (32).

53. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucheron observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x-1$ ($1 =$ longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (\bar{x}) est calculée comme suit :

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

Où :

- x = vitesse de développement moyenne par récipient $i =$ indice de l'intervalle d'observation
- m = nombre maximal d'intervalles d'observation
- f_i = nombre de moucheron émergés durant l'intervalle d'observation i
- n_e = nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience ($=L f_i$)
- x_i = vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1 / \left(\text{jour}_i - \frac{1_i}{2} \right)$$

où :

$$x_i = 1 / (\text{jour}_i - 1/2)$$

jour_i = jour d'observation (compté depuis l'application)

1_i = longueur de l'intervalle d'observation i (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai devra fournir au moins les informations suivantes : Substance d'essai :

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol-eau, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.) ;
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai :

- animal d'essai utilisé : espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage ;

- informations sur la manipulation des amas d'oeufs et des larves ;
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

Conditions expérimentales :

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué ;
- pour les sédiments naturels : localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination ; caractéristiques : pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant.
- préparation du sédiment reconstitué : ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai) ;
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai) ;
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente ;
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau des pores ; poids du sédiment humide avec et sans eau des pores ;
- récipients expérimentaux (matériau et dimension) ;
- méthode de chargement du sédiment : concentrations expérimentales appliquées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant ;
- phase de stabilisation du système sédiment chargé-eau : durée et conditions; justification d'une période étendue de stabilisation ou même d'équilibration (si nécessaire) ;
- conditions d'incubation : température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité) ;
- informations détaillées sur la nourriture : type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats :

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental, y compris l'évaluation du bilan massique si nécessaire;
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux : pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac ;
- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant ;
- nombre de moucheron mâles émergés et nombre de moucheron femelles émergées par récipient et par jour ;
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient ;
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu ;

- pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) ;
- vitesse de développement moyenne des moucherons totalement émergés par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles) ;
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CEx (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEQ, et méthodes statistiques employées pour les déterminer ;
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente Ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.
2. R. Fleming *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996). Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996). Chironomid Sediment toxicity Test.
9. Milani, D., K.E. Day, D.J. McLeay, and R.S. Kirby. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
10. Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

11. Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1):47-57.
12. OECD (2019), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23 (Second Edition), [ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1](#), OECD, Paris.
13. Environment Canada. (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
14. ASTM E1706-20 (2020). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates.
15. OECD (2016), Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264496-en>
16. Suedel, B.C. and J.H. Rodgers. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
17. Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
18. ECHA 2017. Guidance on the Biocidal Regulation. Volume IV Environment – Assessment and Evaluation (Parts B + C). Helsinki (FI).
19. ECHA 2017. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7b: endpoint specific guidance. Helsinki (FI).
20. Dunnett, C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.
21. Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.
22. Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.
23. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.
24. Lehmann, R., J. Bachmann, B. Karaoglan, J. Lacker, C. Polleichtner, H.T. Ratte and M. Ratte (2018). An alternative approach to overcome shortcomings with multiple testing of binary data in ecotoxicology. Stoch. Environ. Res. Risk. Assess. 32: 213–222.
25. EFSA (2019). Pesticide Peer Review meeting on general recurring issues in ecotoxicology (EFSA Supporting publication 2019:EN-1673)
26. OECD (2012), Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
27. Egeler, P., K.S. Henry and C. Riedhammer (2010). Potential effects of food addition to sediment on test conditions in sediment toxicity tests. J. Soils Sediments 10: 377–388.
28. OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Series on Testing and Assessment No. 54, OECD Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264085275-en>.

29. Rao, J.N.K. and A.J. Scott. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.
30. Christensen, E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
31. Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
32. Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

ANNEXE 1- DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice :

- La période de conditionnement est utilisée pour stabiliser le composante microbienne du sédiment et pour enlever p. ex. l'ammoniaque générées par les composants sédimentaires ; cela s'effectue avant d'ajouter la substance d'essai dans le sédiment.
- La période d'équilibration comprend le temps nécessaire pour le partage de la substance d'essai jusqu'à l'équilibre entre les phases aqueuse et sédimentaires.
- La période de stabilisation comprend le temps utilisé après le mélange de la substance d'essai jusqu'au partage de la substance d'essai entre la phase solide, l'eau des pores et l'eau sus-jacente ; cela se produit après l'introduction de la substance d'essai dans le système d'essai sédiment-eau, et idéalement dans les conditions d'exposition (p. ex. la température et l'aération).
- Le sédiment reconstitué, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.
- La croissance : augmentation du poids sec des organismes d'essai pendant l'essai et exprimée en moyenne de poids sec par chironome survivant.
- L'eau sus-jacente est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.
- L'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.
- Le sédiment chargé est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

ANNEXE 2 - RECOMMANDATIONS POUR LA CULTURE DE CHIRONOMUS RIPARIUS

1. Les larves de Chironomus peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'Art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales : 30 x 30 x 30 cm).

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ si elles sont installées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité : environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60% serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de Chironomus reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau : 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

Émergence

8. À $20 \pm 2^\circ\text{C}$, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'oeufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'oeufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'oeufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'oeufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'oeufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucheron adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu

«M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour préparer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

Tableau 1 : Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II) : mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ ⁽¹⁾	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ •4H ₂ O ⁽¹⁾	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ⁽¹⁾	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ •6H ₂ O ⁽¹⁾	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O ⁽¹⁾	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ •2H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CoCl ₂ •6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA•2H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ •7H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

- (1) Ces substances sont dosées différemment en M4 et M7, comme indiqué plus haut
 (2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après

Tableau 2 : Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
CaCl ₂ •2H ₂ O	293800	1,0	293,8
MgSO ₄ •7H ₂ O	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64800	1,0	64,8
NaSiO ₃ •9H ₂ O	50000	0,2	10,0
NaNO ₃	2740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1840	0,1	0,184

Tableau 3 : Solutions mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines seront mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

	Quantité pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantité de solution mère de vitamines ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

Références

Références

Elendt, B.P. (1990) : Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154, 25-23

Elendt B.P. & W.-R. Bias (1990) : Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. Magna*. *Water Research* 24(9), 1157-1167.

ANNEXE 3 - PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit :

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe à sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (:S 1 mm) et séchée à l'air	4-5
Sable quartzique	dimension des particules :>50% des particules doivent mesurer entre 50 et 200 µm	75-76
Argile kaolinique	taux de kaolinite 2 30%	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (±0,5)
Carbonate de calcium	CaCO ₃ , pulvérisé, chimiquement pur	0,05-0,1
Eau	Conductivité :S 10µS/cm	30-50

Préparation

1. La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO₃. On conditionne la suspension durant au moins deux jours en l'agitant doucement à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. On vérifie à nouveau le pH, il devrait atteindre $6,0 \pm 0,5$. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50% du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du CaCO₃, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai subséquent.

Stockage

2. Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

Références

- Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai^o 207 : Ver de terre, Essais de toxicité aiguë (1984). <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>
- Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R. et Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10–20.

ANNEXE 4 - CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO ₃	< 400 mg/l*
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l**
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l**
Chlore organique total	< 25 ng/l**

* S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

** Noter que cette caractéristique s'applique uniquement dans le cas où l'eau du robinet ou une eau de source est utilisée.

ANNEX 5 - CALCUL DU BILAN MASSIQUE LORS D'ESSAIS DE TOXICITÉ DANS UN SYSTÈME EXPÉRIMENTAL SÉDIMENT-EAU ; EXEMPLE D'ESSAI AVEC SÉDIMENT CHARGÉ SUR CHIRONOMUS SP.

1. Lorsqu'on réalise une étude sur des organismes vivant dans les sédiments au moyen d'un système expérimental sédiment-eau avec sédiment chargé (p. ex., LD 218 de l'OCDE) ou eau chargée (p. ex., LD 219 de l'OCDE), le calcul du bilan massique commence par la mesure des concentrations du produit chimique dans le système d'essai ; on tient compte des concentrations observées au début et à la fin de l'étude, ainsi que de toute autre concentration intermédiaire disponible.
2. La présente annexe explique comment calculer le bilan massique dans les études réalisées sur des organismes vivant dans les sédiments avec des sédiments chargés (LD 218 de l'OCDE), en utilisant comme exemples un produit chimique d'essai instable dans le sédiment et un produit chimique d'essai stable dans le sédiment, ces produits chimiques pouvant être par exemple deux pesticides présentant des caractéristiques différentes.
3. Le calcul du bilan massique nécessite une détermination analytique du produit chimique : les informations correspondant à chaque exemple sont fournies dans les tableaux 1A et 2A, respectivement. Dans les deux exemples, les mesures ont été réalisées à trois points temporels (1 h, 7 j et 28 j). Par souci de simplicité, seules les valeurs obtenues aux concentrations la plus basse et la plus haute de l'essai sont indiquées. Cependant, il est recommandé de réaliser des mesures à d'autres concentrations d'essai, en particulier lorsque les produits chimiques sont difficiles à tester (lorsque les concentrations ne sont pas stables dans le système d'essai, par exemple).
4. Le système d'essai des deux exemples ici fournis comprend 0.1 kg de sédiment et 400 mL d'eau sus-jacente ; l'hypothèse est que le volume d'eau interstitielle est de 10 mL. À partir de cette information, il est possible de calculer la quantité de produit chimique répartie dans les différents compartiments en multipliant la concentration par le volume/la quantité d'eau/de sédiment et de calculer le pourcentage présent dans chaque compartiment par rapport à la quantité initialement contenue dans le sédiment chargé. Dans le premier exemple, en l'absence d'information relative aux concentrations dans l'eau interstitielle, on ne tient compte que de la quantité de produit chimique dans l'eau sus-jacente.
5. Afin de connaître le devenir du produit chimique d'essai dans le système sédiment-eau, on a effectué le calcul du bilan massique pour chaque point temporel pour lequel on disposait de mesures (voir tableaux 1B et 2B).

Exemple 1 : Produit chimique d'essai instable dans le sédiment

Tableau 1A : Concentrations mesurées de produit chimique d'essai dans les différents compartiments lors d'une étude avec sédiment chargé sur *Chironomus riparius* réalisée conformément à la LD 218 de l'OCDE.

Concentrations mesurées (mg s.a./kg sédiment sec ou µg s.a./L)									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominale (mg s.a./kg)	Eau sus-jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (mg s.a./kg)	Eau sus-jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (mg s.a./kg)	Eau sus-jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (mg s.a./kg)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
0.125	0.00406	/	0.12	0.784	/	0.06	3.2	/	0.046
2	0.0660	/	1.96	3.39	/	1.1	40.1	/	0.81

s.a. : substance active (produit chimique d'essai) ; LQ : limite de quantification

Tableau 1B : Exemple de calcul du bilan massique du produit chimique d'essai. La quantité présente dans les deux compartiments – sédiment et eau (sus-jacente) – est exprimée en valeur absolue (tableau 1B-1) et en pourcentage (tableau 1B-2) de produit chimique d'essai par rapport à la quantité initialement contenue dans le système (mesurée dans l'eau et dans le sédiment). On notera que les concentrations dans l'eau interstitielle ne sont pas données, ce qui introduit une incertitude significative dans les calculs.

Tableau 1B-1

Quantité (µg) calculée à partir des concentrations mesurées									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominale (µg)	Eau sus-jacente (µg)*	Eau interstitielle (µg)*	Sédiment (µg)*	Eau sus-jacente (µg)	Eau interstitielle (µg)	Sédiment (µg)	Eau sus-jacente (µg)	Eau interstitielle (µg)	Sédiment (µg)
Témoin	< LQ	/	< LQ	< LQ	/	< LQ	< LQ	/	< LQ
12.5	0.0016	/	12	0.3136	/	6.0	1.280	/	4.6
200	0.0264	/	196	1.356	/	110	16.04	/	81

Calculée en partant du principe qu'on dispose de *100 g de sédiment et 400 mL d'eau sus-jacente

Tableau 1B-2

Bilan massique									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominal (µg)	Eau sus- jacente (%)	Eau interstitielle (%)	Sédiment (%)	Eau sus- jacente (%)	Eau interstitielle (%)	Sédiment (%)	Eau sus- jacente (%)	Eau interstitielle (%)	Sédiment (%)
Témoin	< LQ	/	< LQ	< LQ	/	< LQ	< LQ	/	< LQ
12.5	0.013	/	99.987	2.613	/	49.993	10.665	/	38.328
200	0.013	/	99.987	0.692	/	56.115	8.182	/	41.321

6. Dans l'exemple 1, le produit chimique d'essai est détecté presque exclusivement dans le sédiment pendant la première heure (c.-à-d., à un niveau d'environ 99.9 %), ce qui était à prévoir étant donné que le sédiment a été chargé avant le début de l'expérimentation. À la fin de l'étude, en revanche, c'est-à-dire à 28 j, le produit chimique d'essai n'est plus présent dans le sédiment chargé qu'à hauteur d'environ 40 % maximum de la quantité initialement mesurée. Pour ce qui est du compartiment aqueux, seules sont disponibles les concentrations dans l'eau sus-jacente (ce qui génère des incertitudes de calcul) et celles-ci augmentent au fil de l'essai, ce qui vient indiquer une remobilisation/désorption de la substance active du sédiment vers l'eau sus-jacente, la quantité totale atteignant à la fin de l'étude environ 10 % de la quantité initialement mesurée.

7. Pendant cet essai, un phénomène de dégradation se produit : la quantité totale de produit chimique d'essai dans le système expérimental de l'étude représente jusqu'à environ 49 % de la quantité totale initialement mesurée.

Dans de telles circonstances, puisque la différence entre les concentrations mesurées dans le sédiment au début et à la fin de l'essai dépasse 20 %, il est nécessaire d'exprimer les effets mesurés en fonction de la concentration mesurée moyenne (on utilisera de préférence la moyenne arithmétique pondérée dans le temps plutôt que la moyenne géométrique des concentrations mesurées, car les intervalles de temps sont de différentes durées). Il est également fortement recommandé d'analyser toutes les concentrations d'essai ainsi que toute mesure intermédiaire supplémentaire. De plus, il convient de présenter les principaux effets mesurés en fonction de la concentration en mg de produit chimique par kg de sédiment sec et en fonction de la concentration en mg de produit chimique par litre d'eau. Cela permet de tenir compte des deux modes d'exposition des organismes vivant dans les sédiments, à savoir via l'eau et via le sédiment.

Exemple 2 : Produit chimique d'essai stable dans le sédiment

Tableau 2A : Concentrations mesurées de produit chimique d'essai lors d'une étude avec sédiment chargé sur *Chironomus riparius* réalisée conformément à LD 218 de l'OCDE.

Concentrations mesurées (mg s.a./kg sédiment sec ou µg s.a./L)									
Nominale (mg s.a./kg)	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
	Eau sus- jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (mg s.a./kg)	Eau sus- jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (mg s.a./kg)	Eau sus- jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (mg s.a./kg)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
0.125	0.00406	0.798	0.12	0.00784	0.615	0.11	< LQ	0.230	0.094
2	0.0660	25.5	1.96	0.0339	8.63	1.76	< LQ	5.74	1.5

s.a. : substance active (produit chimique d'essai) ; LQ : limite de quantification

Tableau 2B : Exemple de calcul du bilan massique du produit chimique d'essai. La quantité présente dans les deux compartiments – sédiment et eau (sus-jacente et interstitielle) – est exprimée en valeur absolue (tableau 2B-1) et en pourcentage (tableau 2B-2) de produit chimique d'essai par rapport à la quantité initialement contenue dans le système (mesurée dans l'eau et dans le sédiment).

Tableau 2B-1

Quantité calculée à partir des concentrations mesurées									
Nominale (µg dans le sédiment)	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
	Eau sus- jacente (µg)*	Eau interstitielle (µg)*	Sédiment (µg)*	Eau sus- jacente (µg)	Eau interstitielle (µg)	Sédiment (µg)	Eau sus- jacente (µg)	Eau interstitielle	Sédiment (µg)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
12.5	0.0016	0.008	12	0.0031	0.006	11	< LQ	0.002	9.4
200	0.0264	0.255	196	0.0136	0.086	176	< LQ	0.057	150

Calculée en partant du principe qu'on dispose de *100 g de sédiment et 400 mL d'eau sus-jacente et en faisant l'hypothèse que le volume d'eau interstitielle est de 10 mL (incertitudes dans les calculs)

Tableau 2B-2

Bilan massique									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominal (µg)	Eau sus- jacente (%)	Eau interstitiell e (%)	Sédiment (%)	Eau sus- jacente (%)	Eau interstitiell e (%)	Sédiment (%)	Eau sus- jacente (%)	Eau interstitiell e (%)	Sédiment (%)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
12.5	0.013	0.067	99.920	0.026	0.050	91.593	/	0.019	78.271
200	0.013	0.130	99.857	0.007	0.044	89.667	/	0.029	76.421

8. Dans l'exemple 2, le produit chimique d'essai est détecté presque exclusivement dans le sédiment pendant la première heure (c.-à-d., à un niveau d'environ 99.9 %), ce qui est normal étant donné que le sédiment a été chargé avant le début de l'expérimentation. À la fin de l'étude, le produit chimique d'essai est présent dans le sédiment chargé à hauteur d'environ 80 % maximum de la quantité initialement mesurée. Les quantités observées dans les compartiments aqueux (eau sus-jacente et eau interstitielle) sont largement inférieures à celles observées dans le sédiment. La quantité totale de produit chimique d'essai dans le système d'essai (sédiment et eau interstitielle) dans cet exemple représente jusqu'à environ 83 % de la quantité mesurée au début dans le sédiment.

Dans ce cas de figure, il est possible d'exprimer les principaux effets mesurés en fonction des concentrations initiales dans le sédiment (en mg de produit chimique par kg de sédiment sec), car la différence entre les concentrations mesurées et les concentrations initiales n'est pas supérieure à 20 % et parce qu'il n'y a pas d'exposition via l'eau. Il est également recommandé d'analyser toutes les concentrations d'essai ainsi que toute mesure intermédiaire supplémentaire.

On notera qu'il est possible de compléter l'expression des effets mesurés en fonction de la concentration, en formulant cette concentration non seulement en mg de produit chimique par kg de sédiment sec mais aussi en mg de produit chimique par kg de carbone organique.