

ANNEXE 10

DOCUMENT GUIDE SUR LA TRANSFORMATION/DISSOLUTION DES MÉTAUX ET DES COMPOSÉS MÉTALLIQUES EN MILIEU AQUEUX

Annexe 10

DOCUMENT GUIDE SUR LA TRANSFORMATION/DISSOLUTION DES MÉTAUX ET DES COMPOSÉS MÉTALLIQUES EN MILIEU AQUEUX ¹

A.10.1 Introduction

A10.1.1 Ce document guide pour les essais est destiné à déterminer la vitesse et l'ampleur de la formation de composés métalliques, sous une forme soluble, ionique et libre ou autre, à partir de composés métalliques peu solubles et de métaux, en milieu aquatique, dans une série de conditions de laboratoire prédéterminées, représentatives de celles qui règnent généralement dans l'environnement. Une fois obtenues, ces informations peuvent servir à évaluer les toxicités à court et long terme, en milieu aquatique, du métal ou du composé métallique peu soluble qui a engendré l'espèce soluble. Cette orientation pour les essais est le fruit d'une initiative internationale coordonnée par l'OCDE, visant la mise au point d'une approche pour les essais de toxicité et l'interprétation des données se rapportant aux métaux et aux composés métalliques minéraux peu solubles (référence (1) de cette annexe et section A9.7 de l'annexe 9). À la suite d'une série de réunions et discussions tenues récemment au sein de l'OCDE et de l'UE, des travaux expérimentaux sur plusieurs métaux et composés métalliques sur lesquels se fonde ce document guide pour les essais ont été menés et sont consignés dans différents rapports (voir références 5 à 11).

A10.1.2 L'évaluation des toxicités à court et long terme, en milieu aquatique, des composés métalliques peu solubles et des métaux s'effectue par une comparaison entre a) la concentration de l'ion métallique en solution, résultant de la transformation ou de la dissolution dans un milieu aqueux normalisé et b) les valeurs de référence pertinentes de l'écotoxicité obtenues avec le sel métallique soluble (toxicités aiguë et chronique). Le présent document est un guide des essais de transformation/dissolution. La marche à suivre pour établir une classification des dangers pour l'environnement à l'aide des résultats obtenus au moyen du protocole de dissolution/transformation sort du cadre de ce document guide et est décrite en annexe 9, section A9.7.

A10.1.3 Aux fins de ce document guide pour les essais, les transformations des composés métalliques peu solubles et des métaux sont définies et caractérisées comme suit :

- a) Les métaux à l'état élémentaire, M^0 , ne sont pas solubles dans l'eau, mais peuvent se transformer en forme libre. Autrement dit, un métal à l'état élémentaire peut, en réagissant avec le milieu, former des cations ou des anions solubles ; au cours de ce processus, le métal s'oxyde, c'est-à-dire qu'il passe de l'état d'oxydation zéro (neutre) à un état d'oxydation supérieur ;
- b) Dans un composé métallique simple, tel qu'un oxyde ou un sulfure, le métal se trouve déjà à l'état oxydé, si bien qu'il a peu de chances de s'oxyder davantage lorsque le composé est introduit dans un milieu aqueux. Toutefois, si l'état d'oxydation ne change pas, l'interaction avec le milieu risque d'engendrer d'autres formes solubles. On considère qu'un composé métallique peu soluble engendre une petite quantité de la forme libre par dissolution et que son produit de solubilité est calculable. Il faut cependant reconnaître que la concentration de la solution finale peut être influencée par plusieurs facteurs, dont le produit de solubilité de certains composés métalliques précipités durant l'essai de transformation/dissolution, par exemple l'hydroxyde d'aluminium.

¹ Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité ; série sur les essais et évaluations, numéro 29, Direction de l'environnement, Organisation pour la coopération et le développement économique, avril 2001.

A10.2 Principes

A10.2.1 Ce document guide pour les essais se propose de fournir un protocole de référence pour les essais de transformation/dissolution en laboratoire ; ce protocole est fondé sur une procédure expérimentale simple consistant à agiter différentes quantités de la substance d'essai dans un milieu aqueux tamponné et à prélever puis à analyser des échantillons à intervalles de temps fixés, afin de déterminer la concentration des ions métalliques dissous dans l'eau. Le présent document décrit deux types d'essais comme suit.

A10.2.2 *Essai préliminaire de transformation/dissolution – composés métalliques peu solubles*

A10.2.2.1 Pour les composés métalliques peu solubles, la concentration maximale de métal dissous peut être déterminée par la limite de solubilité du composé métallique ou au moyen d'un essai préliminaire de transformation/dissolution. La finalité de l'essai préliminaire, conduit avec une charge unique du produit à tester, est d'identifier les composés qui se dissolvent ou qui se transforment rapidement, si bien que leur potentiel d'écotoxicité ne peut être distingué de celui des formes solubles.

A10.2.2.2 Les composés métalliques peu solubles sous la forme de la plus petite dimension particulière représentée sur le marché, sont introduits en milieu aqueux à une charge unique de 100 mg/l. La dissolution s'obtient par agitation de ce milieu durant 24 heures. À l'issue de cette période d'agitation, on mesure la concentration de l'ion métallique dissous.

A10.2.3 *Essai proprement dit de transformation/dissolution – composés métalliques peu solubles et métaux*

A10.2.3.1 L'essai proprement dit de transformation/dissolution vise à déterminer le degré de dissolution ou de transformation des métaux et des composés métalliques après une certaine période, pour différentes quantités introduites dans la phase aqueuse. Normalement, les formes en masse et/ou pulvérisées sont introduites dans le milieu aqueux à trois concentrations différentes : 1, 10 et 100 mg/l. Une concentration unique de 100 mg/l peut être appliquée si l'on estime que la dissolution ne sera pas majeure. La transformation/dissolution s'effectue selon un procédé d'agitation normalisé qui n'abrase pas les particules. Le résultat de la transformation/dissolution à court terme est calculé en fonction de la concentration en ions métalliques dissous obtenue à l'issue d'une période de 7 jours. Le résultat de la transformation/dissolution à long terme est déterminé à l'aide d'un essai de 28 jours, conduit avec une concentration unique de 1 mg/l.

A10.2.3.2 Comme le pH a une influence sensible sur la transformation/dissolution, l'essai préliminaire et l'essai proprement dit doivent en principe être exécutés à un pH qui maximise la concentration des ions métalliques dissous. Compte tenu des conditions régnant généralement dans les milieux naturels, il faut appliquer une gamme de pH de 6-8,5, sauf pour l'essai proprement dit de 28 jours qui doit se dérouler dans une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5 pour refléter les éventuels effets à long terme dans les lacs acides.

A10.2.3.3 En outre, la surface spécifique des particules de l'échantillon testé ayant une influence notable sur la vitesse et l'ampleur de la transformation/dissolution, les poudres sont testées à la plus petite dimension particulière représentée sur le marché, tandis que les échantillons en masse sont testés à une dimension particulière représentative des manipulations et utilisations normales. En l'absence de cette information, on utilisera un diamètre par défaut de 1 mm. Dans le cas des métaux massifs, cette valeur par défaut ne pourra être dépassée que si ce dépassement est suffisamment justifiable. Il est nécessaire de déterminer la surface spécifique afin de caractériser et comparer des échantillons semblables.

A10.3 Applicabilité de l'essai

Cet essai s'applique à tous les composés métalliques minéraux peu solubles et tous les métaux. Les exceptions, telles que certains métaux réagissant avec l'eau, sont à justifier.

A10.4 Informations sur la substance d'essai

Dans les essais de transformation/dissolution, on doit utiliser les substances telles qu'elles se trouvent sur le marché. Pour interpréter correctement les résultats de l'essai, il est nécessaire d'obtenir les informations suivantes sur la ou les substances d'essai :

- a) Nom de la substance, formule et utilisation sur le marché ;
- b) Procédé physico-chimique de préparation ;
- c) Identification du lot testé ;
- d) Caractéristiques chimiques : pureté globale (%) et impuretés individuelles (% ou ppm) ;
- e) Densité (g/cm³) ou poids spécifique ;
- f) Surface spécifique (m²/g) – mesurée par adsorption-désorption de N₂ selon le procédé BET (Brunauer, Emmett et Teller) ou une technique équivalente ;
- g) Stockage, date d'expiration ;
- h) Informations connues sur la solubilité et les produits de solubilité ;
- i) Identification des dangers et précautions d'utilisation ;
- j) Fiche de données de sécurité (FDS) des matières ou renseignements équivalents.

A10.5 Description de la méthode d'essai

A.9.5.1 Matériel et réactifs

A10.5.1.1 Les essais nécessitent le matériel et les réactifs suivants :

- a) Flacons de prélèvement en verre munis d'un dispositif de fermeture, prélavés et rincés à l'acide (paragraphe A10.5.1.2) ;
- b) Milieu de transformation/dissolution (ISO 6341) (paragraphe A10.5.1.3) ;
- c) Dispositif pour tamponner la solution d'essai (paragraphe A10.5.1.4) ;
- d) Agitateurs : agitateur hélicoïdal, agitateur à pales verticales, agitateur de laboratoire ou appareil équivalent (paragraphe A10.5.1.5) ;
- e) Filtres appropriés (par exemple Acrodisc à 0,2 µm) ou centrifugeuse pour la séparation solide/liquide (paragraphe A10.5.1.7). Le filtre acrodisc devrait être rincé au moins trois fois avec du milieu liquide changé à chaque fois pour éviter la présence de concentrations notables de métaux en traces dans l'échantillon à l'instant 0 ;
- f) Dispositif de régulation de la température des réacteurs à ± 1,5°C près dans l'intervalle 20 - 23 °C ;
- g) Seringues et/ou pipettes automatiques ;
- h) pH-mètre affichant des résultats fiables dans un intervalle de 0,2 unité de pH ;
- i) Appareil permettant de mesurer l'oxygène dissous et affichant la température ;
- j) Thermomètre ou thermocouple ; et

- k) Appareillage d'analyse des métaux (par exemple spectromètre d'adsorption atomique, spectromètre d'émission de plasma axial couplé par induction) de précision acceptable, ayant de préférence une limite de quantification cinq fois plus basse que la plus basse valeur de référence d'écotoxicité chronique;

A10.5.1.2 Tout le matériel en verre doit être nettoyé soigneusement, selon les pratiques normalisées de laboratoire, rincé à l'acide (par exemple HCl) puis à l'eau désionisée. Le réacteur expérimental (cuve de un à deux litres) doit pouvoir contenir un à deux litres de milieu aqueux sans que celui-ci déborde durant la période d'agitation. Si le milieu est tamponné à l'air (essais menés à pH 8), il est conseillé d'augmenter la capacité de tamponnage du milieu par un accroissement du rapport espace de tête /liquide (par exemple 1 l de milieu dans un récipient de 2,8 l).

A10.5.1.3 Il convient d'utiliser une eau reconstituée conforme à la norme ISO 6341², comme milieu de transformation/dissolution standard. Le milieu doit être stérilisé par filtration (0,2 µm) avant d'être employé dans les essais. La composition chimique du milieu de transformation/dissolution normalisé (pour des essais conduits à pH 8) est la suivante :

NaHCO₃ : 65.7 mg/l
KCl : 5.75 mg/l
CaCl₂.2H₂O : 294 mg/l
MgSO₄.7H₂O : 123 mg/l

Le paragraphe A10.5.1.7 donne les compositions chimiques adaptées aux essais effectués à des valeurs de pH inférieures ou supérieures.

A10.5.1.4 La concentration du carbone organique total dans le milieu ne doit pas dépasser 2,0 mg/l.

A10.5.1.5 L'utilisation d'un milieu marin normalisé, en plus du milieu d'eau douce, pourra aussi être envisagé si la solubilité ou la transformation du composé métallique risque d'être sensiblement affectée par la teneur en chlorures élevée ou par d'autres caractéristiques chimiques propres à l'eau de mer et si l'on dispose de données expérimentales de toxicité sur des espèces marines. Le cas échéant, la composition chimique du milieu marin normalisé sera la suivante :

NaF : 3mg/l
SrCl₂.6H₂O : 20mg/l
H₃BO₃ : 30mg/l
KBr : 100mg/l
KCl : 700mg/l
CaCl₂.2H₂O : 1,47g/l
Na₂SO₄ : 4,0g/l
MgCl₂.6H₂O : 10,78g/l
NaCl : 23,5g/l
Na₂SiO₃.9H₂O : 20mg/l
NaHCO₃ : 200mg/l

Avec une salinité de 34 ± 0,5 g/kg et un pH de 8,0 ± 0,2, l'eau de mer reconstituée doit aussi être débarrassée de toute trace de métaux (ASTM E 729-96).

² Aux fins de la classification des dangers, les résultats obtenus en suivant le protocole de dissolution/transformation sont comparés aux données d'écotoxicité existantes pour les métaux et les composés métalliques. Toutefois, s'il s'agit notamment de valider des données, il pourra être indiqué dans certains cas d'utiliser le milieu aqueux final d'un essai de transformation (mené à son terme) directement dans un essai d'écotoxicité de l'OCDE sur les daphnies ou sur les poissons (Ligne directrice 202 ou 203). Si les concentrations de CaCl₂.2H₂O et MgSO₄.7H₂O du milieu de transformation sont réduites à un cinquième de celles du milieu ISO 6341, le milieu final de l'essai de transformation peut aussi être utilisé (après l'ajout de micronutriments) dans l'essai d'écotoxicité sur les algues de l'OCDE (Ligne directrice 201).

A10.5.1.6 Les essais de transformation/dissolution doivent être exécutés à un pH qui maximise la concentration des ions métalliques dissous, et ceci dans l'intervalle de pH prescrit. On appliquera une gamme de pH de 6 à 8,5 à l'essai préliminaire et à l'essai de sept jours, et une gamme de 5,5 à 8,5 à l'essai de 28 jours (par. A10.2.3.2).

A10.5.1.7 Le milieu peut être tamponné à un pH= 8 grâce à un équilibre avec l'air, dans lequel la concentration de CO₂ exerce un pouvoir tampon suffisant pour maintenir le pH à une valeur comprise dans un intervalle de ± 0,2 unités sur une période d'une semaine (référence 7, annexe 10). L'augmentation du rapport espace libre surnageant/liquide permet d'améliorer la capacité de tamponnage à l'air du milieu aqueux.

Les compositions chimiques recommandées pour ajuster le milieu liquide à pH 7 et 6 et jusqu'à 8 et 8,5, sont reproduites au tableau A10.1, ainsi que les concentrations de CO₂ à maintenir dans l'air à insuffler.

Tableau A10.1 : Composition chimique du milieu d'essai

Composition chimique du milieu liquide	NaHCO ₃	6,5 mg/l	12,6 mg/l	64,75 mg/l	194,25 mg/l
	KCl	0,58 mg/l	2,32 mg/l	5,75 mg/l	5,74 mg/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	29,4 mg/l	117,6 mg/l	294 mg/l	29,4 mg/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	12,3 mg/l	49,2 mg/l	123,25 mg/l	123,25 mg/l
Concentration de CO ₂ (complétée avec de l'air) dans le récipient expérimental		0,50%	0,10%	0,038 % (air)	0,038 % (air)
pH calculé		6,09	7,07	7,98	8,5

NOTE 1 : Les valeurs de pH ont été calculées à l'aide du système FACT (Facility for the Analysis of Chemical Thermodynamics), (<http://www.crct.polymtl.ca/fact/fact.htm>).

2: Bien que le Protocole ait seulement été validé pour la plage de pH de 6,0 à 8,0, rien dans ce tableau n'empêche de descendre à pH 5,5. La composition pour pH 8,5 n'a pas été vérifiée expérimentalement en présence de métal.

A10.5.1.8 D'autres méthodes équivalentes pour tamponner le milieu liquide peuvent être appliquées à condition que le tampon choisi n'ait qu'une influence minime sur la vitesse de transformation et de spéciation chimique de la fraction métallique dissoute. Le pH ne devrait pas être ajusté au cours de l'essai au moyen d'un acide ou d'une base.

A10.5.1.9 Durant les essais de transformation/dissolution proprement dits, l'agitation du milieu devra être suffisante pour maintenir une vitesse de passage du liquide sur la substance suffisante et préserver l'intégrité de la surface de la substance d'essai et de tous les produits de réaction solides susceptibles de se former à la surface de cette substance d'essai. Pour ce faire, on aura recours au matériel expérimental suivant (pour un litre de milieu aqueux) :

- a) un agitateur à pales verticales tournant à 200 tours par minute, dont les pales sont disposées à 5 cm du fond d'une cuve d'essai d'1 l. Les agitateurs à pales verticales radiales se composent de deux pales en polypropylène de 40 mm de large sur 15 mm de haut calées sur un axe en acier recouvert de PVC de 8 mm de diamètre et de 350 mm de long ; ou
- b) un flacon de 1,0 à 3,0 l fermé par un bouchon en caoutchouc et placé sur un agitateur hélicoïdal ou un agitateur de laboratoire réglé à 100 tours par minute.

D'autres méthodes d'agitation douce peuvent être utilisées à condition de respecter l'intégrité de la surface de la substance d'essai et l'homogénéité de la solution.

A10.5.1.10 Avant de choisir la méthode de séparation solide-liquide, il faut vérifier si les ions métalliques solubles s'adsorbent sur les filtres et si la méthode d'agitation prescrite au paragraphe A10.5.1.9 engendre une suspension, ce qui dépendra de la distribution des dimensions particulières et de la densité des particules. Dans le cas d'un solide dont la densité dépasse 6 g/cm^3 environ, et dont la dimension des particules est faible ($50\% < 8 \mu\text{m}$), l'expérience a montré qu'il est peu probable que les méthodes d'agitation douce décrites au A10.5.1.9 engendrent des suspensions. Si bien que la filtration d'un échantillon à travers une membrane en polyéthersulfone hydrophile (de 25 mm de diamètre et $0,2 \mu\text{m}$) montée sur une seringue, et éventuellement recouverte d'un préfiltre de $0,8 \mu\text{m}$, par exemple, produira une solution pratiquement dépourvue de solides. Néanmoins, s'il y avait formation d'une suspension, il faudrait interrompre l'agitation durant 5 minutes environ, le temps que la suspension se redépose, avant de prélever un échantillon de solution.

A10.5.2 *Conditions préalables*

A10.5.2.1 *Méthode d'analyse*

Il est capital pour l'étude que l'analyse des métaux dissous totaux repose sur une méthode appropriée validée. La limite de détection analytique doit être inférieure à la valeur pertinente obtenue au cours des essais d'écotoxicité chronique ou à long terme.

Il faudra au moins mentionner les aspects suivants en ce qui concerne la validation de la méthode d'analyse :

- a) Limite de détection et de quantification de la méthode d'analyse ;
- b) Intervalle de linéarité analytique dans l'intervalle analytique applicable ;
- c) Essai à blanc sur le milieu de transformation seul (ceci peut être fait durant les essais ;
- d) Effet matriciel du milieu de transformation sur la mesure de l'ion métallique dissous ;
- e) Bilan massique (%) à la fin de l'essai de transformation ;
- f) Reproductibilité des analyses ;
- g) Adsorption éventuelle des ions métalliques solubles sur les filtres (si la filtration est utilisée pour séparer les ions métalliques solubles du métal solide).

A10.5.2.2 *Détermination du pH approprié au milieu de dissolution*

Si les publications ne le mentionnent pas, il faudra peut-être effectuer un essai préliminaire, afin de s'assurer que l'essai est pratiqué à un pH qui maximise la transformation/dissolution dans la gamme de pH indiquée aux A10.2.3.2 et A10.5.1.6.

A10.5.2.3 *Reproductibilité des résultats de la transformation*

A10.5.2.3.1 Pour un montage courant comprenant trois essais identiques en parallèle et pour deux échantillons prélevés par récipient et par heure, il est raisonnable de prévoir qu'avec une quantité constante de la substance, testée dans une gamme étroite de dimension particulière (par exemple $37\text{-}44 \mu\text{m}$) et de surface totale, la variation des résultats de la transformation devra être $< 10\%$ dans un même récipient et $< 20\%$ entre les différents récipients (référence 5 de la présente annexe).

A10.5.2.3.2 Les paragraphes qui suivent donnent des indications sur la marche à suivre pour estimer la reproductibilité d'un essai de transformation. Grâce à ces résultats, on pourra améliorer la reproductibilité en ajustant le montage expérimental final, et ce en faisant varier le nombre d'essais expérimentaux identiques et/ou le nombre d'échantillons prélevés par paire, ou en triant davantage les particules. Les essais préliminaires permettent aussi de pratiquer une évaluation de la vitesse de transformation de la substance d'essai et peuvent servir à déterminer une fréquence adéquate pour les prélèvements.

A10.5.2.3.3 En préparant le milieu de transformation/dissolution, on ajustera le pH du milieu à la valeur désirée (tamponnage à l'air ou au CO₂) en l'agitant durant environ une demi heure, afin d'amener le milieu aqueux à l'équilibre avec l'atmosphère tampon. On prélève au moins trois échantillons (par exemple 10 à 15 ml) du milieu d'essai avant d'ajouter la substance et on relève les concentrations de métal dissous qui sont considérées comme des concentrations témoins ou de fond.

Au moins cinq récipients expérimentaux, contenant le métal ou le composé métallique (par exemple 100 mg de solide/l de milieu) sont agités conformément aux instructions du A10.5.1.9, à une température ne variant pas de plus de $\pm 1,5$ °C dans l'intervalle 20 – 23 °C, et trois échantillons sont prélevés à la seringue dans chaque récipient expérimental après 24 heures. Les échantillons sont filtrés sur un filtre à membrane conformément à ce qui est décrit au A10.5.1.10, la solution est acidifiée avec une ou deux gouttes de HNO₃ de qualité métal-trace pour obtenir un pH de 1, et analysée. L'analyse permet de déterminer la concentration totale des métaux dissous.

A10.5.2.3.4 On calcule les moyennes et les coefficients de variation des concentrations mesurées de métaux dissous à l'intérieur d'un même récipient et entre les récipients.

A10.5.2.3.5 Pour garantir la reproductibilité des résultats de la transformation, il est recommandé:

- a) que les laboratoires nouveaux utilisent un équipement de formation;
- b) qu'une poudre métallique ayant un état de surface spécifié soit utilisée comme échantillon témoin;
- c) qu'un ou deux laboratoires soient responsables pour les produits chimiques de référence.

Il peut être nécessaire de contrôler la surface spécifique des poudres.

A10.5.3 *Conduite de l'essai*

A10.5.3.1 *Essai préliminaire de dissolution – composés métalliques peu solubles*

A10.5.3.1.1 Après préparation, le milieu de dissolution est réparti dans au moins trois récipients (ce nombre dépend de la reproductibilité obtenue au cours de l'essai préliminaire). Le milieu aqueux est agité durant 30 minutes afin de l'amener à l'équilibre avec l'atmosphère ou le système tampon (A10.5.1.6 à A10.5.1.8) et le pH, la température et la concentration d'O₂ dissous dans le milieu mesurés. Ensuite, on prélève au moins deux échantillons (10 – 15 ml) du milieu d'essai (avant l'addition des matières solides à tester) et on mesure la concentration en métal dissous, laquelle correspond à la concentration témoin ou de fond.

A10.5.3.1.2 Le composé métallique est alors introduit dans les récipients à une charge de 100 mg/l, et les récipients sont couverts et agités rapidement et vigoureusement. Après 24 heures d'agitation, on mesure le pH, la température et la concentration d'O₂ dissous dans chaque récipient, on prélève deux à trois échantillons de solution de chaque récipient au moyen d'une seringue et on filtre la solution à travers un filtre à membrane, conformément aux instructions du A10.5.1.10. La solution est ensuite acidifiée (par exemple avec 1 pour cent de HNO₃) et analysée pour déterminer la concentration totale des métaux dissous.

A10.5.3.2 *Essai proprement dit – métaux et composés métalliques*

A10.5.3.2.1 Répéter la procédure exposée au A10.5.3.1.1

A10.5.3.2.2 Pour l'essai de sept jours, la substance est introduite à des concentrations initiales respectives de 1, 10, 100 mg/l dans les récipients expérimentaux (dont le nombre dépend de la reproductibilité, laquelle aura été établie conformément au A10.5.2.3) contenant le milieu aqueux. Les récipients sont fermés et agités selon les instructions du A10.5.1.9. Si un essai de 28 jours est requis, l'essai conduit avec une charge de 1 mg/l peut être prolongé jusqu'à 28 jours, à condition qu'il soit pratiqué à la même valeur de pH que l'essai

de 7 jours. Toutefois, comme les essais de 7 jours ne sont réalisés qu'à des valeurs de pH de 6 ou supérieures, il est nécessaire d'effectuer d'autres essais de 28 jours pour couvrir la gamme de pH comprise entre 5,5 et 6. Il peut aussi être utile d'inclure un témoin en parallèle ne renfermant pas la substance à tester (milieu d'essai seul). À l'issue d'intervalles de temps déterminés (par exemple 2 heures, 6 heures, 1, 4 et 7 jours), on mesure la température, le pH et la concentration d'O₂ dissous dans chaque récipient, l'on prélève au moins deux échantillons (par exemple 10 à 15 ml) à la seringue dans chacun d'entre eux. Il faut ensuite séparer les fractions solides et dissoutes, conformément aux instructions du A10.5.1.10, acidifier les solutions (par exemple avec 1 pour cent de HNO₃) et les analyser pour mesurer la concentration en métal dissous. Après une première période de 24 heures, on ramènera le volume des solutions à sa valeur initiale en ajoutant un volume de milieu de dissolution initial équivalent à celui ayant déjà été prélevé. Cette procédure est à répéter lors des prélèvements suivants. Le volume (total) maximal prélevé des récipients ne doit pas dépasser 20 % du volume initial de la solution d'essai. Il peut être mis un terme à l'essai lorsque l'on obtient successivement trois valeurs de la concentration totale du métal dissous ne variant pas de plus de 15 %. La durée maximale d'essai aux concentrations de 10 et 100 mg/l est de sept jours (essai à court terme) et celle de la charge de 1 mg/l (essai à long terme) est de 28 jours.

A10.5.4 *Conditions expérimentales*

A10.5.4.1 Les essais de transformation/dissolution doivent s'effectuer à température constante ($\pm 1,5$ °C) dans l'intervalle de 20 – 23 °C.

A10.5.4.2 Les essais de transformation/dissolution sont conduits dans la gamme de pH indiquée aux A10.2.3.2 et A10.5.1.6. Le pH de la solution d'essai doit être noté à chaque prélèvement. Le pH devrait demeurer constant ($\pm 0,2$ unités) durant la plupart des essais, toutefois, certaines variations de pH à court terme ont été observées avec des poudres fines réactives (référence 7 de cette annexe) chargées à 100 mg/l, variations qui résultent des propriétés inhérentes de la substance à l'état finement divisé.

A10.5.4.3 La phase gazeuse qui surmonte le milieu aqueux dans le récipient expérimental devrait permettre, dans la plupart des cas, de maintenir une concentration en oxygène dissous au-dessus de 6,0 mg/l, ce qui correspond à 70% de la concentration de saturation de 8,5 mg/l. Cependant, dans certains cas, la cinétique réactionnelle risque d'être limitée, non pas par la disponibilité de l'oxygène moléculaire dans l'espace libre au-dessus de la solution, mais par le transfert d'oxygène dissous à travers l'interface solide-solution et l'entraînement du produit réactionnel hors de cette interface. Dans ce cas, la seule chose à faire est d'attendre le rétablissement de l'équilibre.

A10.5.4.4 Afin de réduire les interférences chimique et biologique ainsi que l'évaporation, les essais seront effectués dans des récipients fermés et dans l'obscurité, chaque fois que cela est possible.

A10.6 **Traitement des résultats**

A10.6.1 *Essai préliminaire*

Les concentrations moyennes de métal dissous en 24 heures peuvent être calculées et les valeurs exprimées avec les intervalles de confiance.

A10.6.2 *Essai proprement dit : Détermination de l'ampleur de la transformation/dissolution*

A10.6.2.1 *Essai à court terme*

Il faut tracer la courbe des concentrations de métal dissous, mesurées au cours des essais à court terme (7 jours), en fonction du temps et déterminer, si possible, la cinétique de transformation/dissolution. Les modèles cinétiques suivants pourraient être utilisés pour décrire les courbes de transformation/dissolution :

a) Modèle linéaire :

$$C_t = C_0 + kt, \text{ mg/l}$$

où :

C_0 = concentration totale initiale de métal dissous (mg/l) au moment $t = 0$;

C_t = concentration totale de métal dissous (mg/l) au temps t ;

k = constante de vitesse linéaire, mg/l/jour.

b) Modèle de premier ordre :

$$C_t = A (1 - e^{-kt}), \text{ mg/l}$$

où :

A = concentration limite de métal dissous (mg/l) à l'équilibre apparent = constante ;

C_t = concentration totale de métal dissous (mg/l) au temps t ;

k = constante de vitesse de premier ordre, 1/jour.

c) Modèle de deuxième ordre :

$$C_t = A (1 - e^{-at}) + B (1 - e^{-bt}), \text{ mg/l}$$

où :

C_t = concentration totale de métal dissous (mg/l) au temps t ;

a = constante de vitesse de premier ordre, 1/jours ;

b = constante de vitesse de deuxième ordre, 1/jours ;

C = $A + B$ = concentration limite de métal dissous (mg/l).

d) Équation de la cinétique réactionnelle :

$$C_t = a [1 - e^{-bt} - (c/n) \{1 + (be^{-nt} - ne^{-bt})/(n - b)\}], \text{ mg/l}$$

où :

C_t = concentration totale de métal dissous (mg/l) au temps t ;

a = coefficient de régression (mg/l) ;

b, c, d = coefficients de régression (1/jour) ;

n = $c + d$.

D'autres types d'équations de cinétique réactionnelle peuvent aussi convenir (7,8).

Pour chaque réplikat de récipient expérimental suivi dans l'essai de transformation, les paramètres caractéristiques de la modélisation doivent être estimés par des analyses de régression. Cette procédure évite d'éventuels problèmes de corrélation entre des mesures successives du même réplikat. Les valeurs moyennes des coefficients peuvent être comparées à l'aide d'une analyse classique de la variance, si l'essai a compté au moins trois récipients expérimentaux. L'estimation du coefficient de détermination, r^2 , permet de mesurer la « qualité d'ajustement ».

A10.6.2.1 Essai à long terme

Les concentrations de métal dissous, mesurées avec une charge de 1 mg/l durant l'essai de 28 jours sont portées sur un graphique en fonction du temps ; l'on détermine ensuite la cinétique de transformation/dissolution, si possible, conformément à ce qui est décrit aux A10.6.1 et A10.6.2.

A10.7 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit au moins inclure les informations suivantes (voir aussi A10.4 et A10.5.2.1) :

- a) Identification du commanditaire et du laboratoire qui a conduit les essais ;
- b) Description de la substance d'essai ;
- c) Description du milieu d'essai reconstitué et des quantités de métal testées ;
- d) Système tampon utilisé pour le milieu et validation du pH utilisé (comme indiqué en A10.2.3.2 et de A10.5.1.6 à A10.5.1.8) et description de la méthode d'analyse ;
- e) Description détaillée de la procédure et du montage expérimental ;
- f) Préparation de la solution métallique normalisée ;
- g) Résultats de la méthode de validation ;
- h) Résultats d'analyse des concentrations en métaux, du pH, de la température et de la concentration en oxygène ;
- i) Dates des essais et des analyses pratiqués aux différents intervalles de temps ;
- j) Concentrations moyennes de métal dissous à la fin de chaque intervalle de temps (avec intervalles de confiance) ;
- k) Courbes de transformation (concentration totale de métal dissous en fonction du temps) ;
- l) Résultats de la cinétique de transformation/dissolution, le cas échéant ;
- m) Estimation de l'équation de la cinétique réactionnelle, le cas échéant ;
- n) Justification des éventuels écarts par rapport au protocole opératoire ;
- o) Description de toutes les circonstances qui auraient affecté les résultats ; et
- p) Référence aux données antérieures et aux données brutes.

Annexe 10

Appendice

Références

1. «Draft Report of the OECD Workshop on Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble Metals, Inorganic Metal Compounds and Minerals», Sept. 5-8, 1995, Ottawa.
2. OCDE, réunion du Groupe de travail sur les métaux, Paris, 18-19 juin 1996.
3. Bureau européen des substances chimiques. Meeting on Testing Methods for Metals and Metal Compounds, Ispra, February 17-18, 1997.
4. OCDE, réunion du Groupe de travail sur les métaux, Paris, 14-15 octobre 1997.
5. LISEC^{*1} Staff, «Final report «transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - zinc», LISEC no. BO-015 (1997).
6. J.M. Skeaff² and D. Paktunc, «Development of a Protocol for Measuring the Rate and Extent of Transformations of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Aqueous Media. Phase I, Task 1 : Study of Agitation Method.» Final Report, January 1997. Mining and Mineral Sciences Laboratories Division Report 97-004(CR)/Contract No. 51545.
7. Jim Skeaff and Pierrette King, «Development of a Protocol For Measuring the Rate and Extent of Transformations of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Aqueous Media. Phase I, Tasks 3 and 4 : Study of pH and of Particle Size/Surface Area.», Final Report, December 1997. Mining and Mineral Sciences Laboratories Division Report 97-071(CR)/Contract No. 51590.
8. Jim Skeaff and Pierrette King, Development of Data on the Reaction Kinetics of Nickel Metal and Nickel Oxide in Aqueous Media for Hazard Identification, Final Report, January 1998. Mining and Mineral Sciences Laboratories Division Report 97-089(CR)/Contract No. 51605.
9. LISEC Staff, «Final report «transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - zinc oxide», LISEC no. BO-016 (January, 1997).
10. LISEC Staff, «Final report «transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - cadmium», LISEC no. WE-14-002 (January, 1998).
11. LISEC Staff, «Final report «transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - cadmium oxide», LISEC no. WE-14-002 (January, 1998).

Bibliographie

1. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (1984).
Ligne directrice 201 : Algues, essai d'inhibition de la croissance.
2. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (1984).
Ligne directrice 202 : Daphnia sp. Essai d'immobilisation immédiate et essai de reproduction.
3. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (1992).
Ligne directrice 203 : Poisson, essai de toxicité aiguë.
4. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (1992).
Ligne directrice 204 : Poisson, essai de toxicité prolongée : étude de 14 jours.
5. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (1992).
Ligne directrice 210 : Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie.
6. Norme internationale ISO 6341 (1989 (E)). Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Essai de toxicité aiguë.

¹ LISEC, Craenevenne 140, 3600 Genk, Belgique.

² CANMET, Ressources naturelles Canada, 555 Booth St., Ottawa, Canada K1A 0G1.

