

## WETTEN, DECRETEN, ORDONNANTIES EN VERORDENINGEN LOIS, DECRETS, ORDONNANCES ET REGLEMENTS

### MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN, VOLKSGEZONDHEID EN LEEFMILIEU

N. 2002 — 2991

[C — 2002/22604]

**17 JULI 2002.** — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

ALBERT II, Koning der Belgen,

Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 21 december 1998 betreffende de productnormen ter bevordering van duurzame productie- en consumptiepatronen en ter bescherming van het leefmilieu en de volksgezondheid, inzonderheid op artikel 5, § 1, eerste lid 5°, 6°, 9° en 10°;

Gelet op de richtlijn 2001/59/EG van de Commissie van 6 augustus 2001 tot achtentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen;

Gelet op het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989, 19 juli 1994, 13 november 1997, 14 december 1998, 25 november 1999, 4 februari 2000, van 28 september 2000 van 11 juli 2001 en van 14 september 2001 waarvan artikel 2, § 7, 1°, e, tweede lid, gewijzigd werd door het ministerieel besluit van 5 september 2001 en waarvan bijlage VI gerectificeerd werd door het ministerieel besluit van 10 oktober 2000;

Gelet op de omstandigheid dat de Gewestregeringen bij het ontwerpen van dit besluit betrokken zijn;

Gelet op het advies van de Federale Raad voor Duurzame Ontwikkeling van 16 april 2002;

Gelet op het advies van de Hoge Gezondheidsraad van 20 maart 2002;

Gelet op het advies van de Raad voor het Verbruik van 13 juni 2002;

Gelet op het advies van de Centrale Raad voor het Bedrijfsleven van 2 mei 2002;

Gelet op het advies van de Inspecteur van Financiën van 14 februari 2002;

Gelet op het akkoord van de Minister van Begroting, gegeven op 21 maart 2002;

Gelet op de beraadslaging van de Ministerraad betreffende de adviesaanvraag binnen een termijn van één maand;

Gelet op het advies van de Raad van State 33490/3, gegeven op 2 juli 2002, met toepassing van artikel 84, eerste lid, 1°, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, vervangen bij de wet van 4 augustus 1996;

Op de voordracht van Onze Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

**Artikel 1.** De bijlagen van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, worden gewijzigd als volgt :

1° Bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd door de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998, 4 februari 2000, 11 juli 2001 en van 14 september 2001 wordt gewijzigd als volgt :

a) hoofdstuk B.1. Acute orale toxiciteit wordt geschrapt;

b) de laatste zin van punt 1.4.2.2. van de franse versie van hoofdstuk B.39 wordt vervangen door de tekst van bijlage IA;

c) de testmethode voor de subchronische orale toxiciteitstest bij knaagdiersoorten wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage IB van dit besluit die hoofdstuk B.26 - Subchronische orale toxiciteitstest 90 dagen-test met herhaalde orale toediening aan knaagdiersoorten - vervangt;

### MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES, DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT

F. 2002 — 2991

[C — 2002/22604]

**17 JUILLET 2002.** — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement

ALBERT II, Roi des Belges,

A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 21 décembre 1998 relative aux normes de produits ayant pour but la promotion de modes de production et de consommation durables et la protection de l'environnement et de la santé, notamment l'article 5, § 1<sup>er</sup>, premier alinéa, 5°, 6°, 9° et 10°;

Vu la directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses;

Vu l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989, 19 juillet 1994, 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, 25 novembre 1999, 4 février 2000, du 28 septembre 2000, du 11 juillet 2001 et du 14 septembre 2001 dont l'article 2, § 7, 1°, e, alinéa 2, a été modifié par l'arrêté ministériel du 5 septembre 2001 et dont l'annexe VI a été rectifiée par l'arrêté ministériel du 10 octobre 2000;

Vu l'association des Gouvernements de région à l'élaboration du présent arrêté;

Vu l'avis du Conseil fédéral du Développement durable du 16 avril 2002;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'Hygiène publique du 20 mars 2002;

Vu l'avis du Conseil de la Consommation du 13 juin 2002;

Vu l'avis du Conseil central de l'Economie du 2 mai 2002;

Vu l'avis de l'Inspecteur des Finances, donné le 14 février 2002;

Vu l'accord du Ministre du Budget, donné le 21 mars 2002;

Vu la délibération du Conseil des Ministres sur la demande d'avis dans un délai d'un mois;

Vu l'avis du Conseil d'Etat 33490/3, donné le 2 juillet 2002 en application de l'article 84, alinéa 1<sup>er</sup>, 1°, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, remplacé par la loi du 4 août 1996;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

**Article 1<sup>er</sup>.** Les annexes de l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, sont modifiées comme suit :

1° L'annexe V complétée par l'arrêté royal du 14 septembre 1989 et modifiée par les arrêtés royaux des 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, 4 février 2000, 11 juillet 2001 et du 14 septembre 2001 est modifiée comme suit :

a) le chapitre B.1. Toxicité aiguë (administration orale) est supprimé;

b) dans la version française, la dernière phrase du paragraphe 1.4.2.2. du chapitre B.39 est remplacée par le texte figurant à l'annexe IA;

c) la méthode d'essai pour les essais de toxicité orale subchronique sur des rongeurs est modifiée conformément à l'annexe IB du présent arrêté qui remplace le chapitre B 26 - Toxicité orale subchronique : expérience de 90 jours sur des rongeurs;

d) de testmethode voor de subchronische orale toxiciteitstest bij niet-knaagdiersoorten wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage IC van dit besluit die hoofdstuk B.27 - Subchronische orale toxiciteitstest : 90 dagen test met herhaalde orale toediening aan niet-knaagdiersoorten - vervangt;

e) de zeven nieuwe testmethoden voor de milieutoxiciteit in bijlage ID van dit besluit worden in deel C opgenomen.

2° Bijlage VI, vervangen bij het koninklijk besluit van 19 juli 1994, en gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 25 november 1999 en 28 september 2000 en bij het ministerieel besluit van 10 oktober 2000, wordt vervangen door bijlage II van dit besluit;

3° In bijlage VII A worden de volgende wijzigingen aangebracht :

a) de tekst in bijlage III A van dit besluit wordt ingevoegd voor punt 0 van bijlage VII A;

b) de tekst in bijlage III B van dit besluit wordt ingevoegd aan het eind van bijlage VII A.

4° In bijlage VIII worden de volgende wijzigingen aangebracht :

a) de tekst in bijlage IV A van dit besluit wordt gevoegd tussen « Niveau 1 » en « Fysisch chemisch onderzoek » van bijlage VIII;

b) de tekst in bijlage IV B van dit besluit wordt gevoegd tussen « Niveau 2 » en « Toxicologisch onderzoek » van bijlage VIII.

5° De vermelding in het eerste lid van bijlage X « , gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995, » wordt opgeheven.

**Art. 2.** Onze Minister bevoegd voor Leefmilieu is belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken,  
Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

d) la méthode d'essai pour les essais de toxicité orale subchronique sur des espèces n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs est modifiée conformément à l'annexe IC du présent arrêté qui remplace le chapitre B. 27 - Toxicité orale subchronique : expérience de 90 jours sur des espèces n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs;

e) les sept nouvelles méthodes d'essai pour la toxicité environnementale de l'annexe ID du présent arrêté sont incluses à la partie C.

2° L'annexe VI, remplacée par l'arrêté royal du 19 juillet 1994 et modifiée par les arrêtés royaux des 13 novembre 1997, 25 novembre 1999 et 28 septembre 2000 ainsi que par l'arrêté ministériel du 10 octobre 2000, est remplacée par l'annexe II du présent arrêté;

3° Les modifications suivantes sont apportées à l'annexe VII A :

a) le texte de l'annexe III A du présent arrêté est inséré avant la section 0 de l'annexe VII A;

b) le texte de l'annexe III B du présent arrêté est inséré à la fin de l'annexe VII A.

4° Les modifications suivantes sont apportées à l'annexe VIII :

a) le texte de l'annexe IV A du présent arrêté est inséré entre « Niveau 1 » et « Etudes physico-chimiques » de l'annexe VIII;

b) le texte de l'annexe IV B du présent arrêté est inséré entre « Niveau 2 » et « Etudes toxicologiques » de l'annexe VIII.

5° Au premier alinéa de l'annexe X, la mention « , modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995 » est abrogée.

**Art. 2.** Notre Ministre qui a l'Environnement dans ses attributions est chargée de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation,  
de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

#### Bijlage 1A

L'administration du témoin positif par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai est acceptable  
Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

#### Bijlage IB

##### B.26. SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST

##### TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAAL) OP KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)

##### 1. METHODE

De methode die voor deze subchronische orale toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 408 (1998).

##### 1.1 INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests of toxiciteitstests met herhaalde toediening (28 dagen) eerste informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de subchronische orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Het onderzoek van 90 dagen levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde langdurige blootstelling vanaf de tijd na het spenen en de groeitijd tot aan de volgroeidheid. Het onderzoek zal informatie opleveren over de belangrijkste toxische effecten, er zullen organen die beschadigd kunnen worden en de mogelijkheid van accumulatie worden aangegeven, en er kan een inschatting worden gemaakt van een blootstellingsniveau zonder schadelijk effect, dat kan worden gebruikt bij de keuze van dosisniveaus voor chronische onderzoeken en voor de vaststelling van veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens.

De methode legt extra nadruk op de neurologische eindpunten en geeft een indicatie van de immunologische effecten en de effecten voor de voortplantingsorganen. Bovendien wordt benadrukt dat het van groot belang is de dieren klinisch zorgvuldig te observeren, om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. Met dit onderzoek moeten chemische stoffen geïdentificeerd kunnen worden die neurotoxische of immunologische effecten kunnen hebben of die schadelijk voor de voortplantingsorganen kunnen zijn, waardoor verder diepteonderzoek gerechtvaardigd kan worden.

Zie ook algemene inleiding deel B.

## 1.2 DEFINITIES

**Dosis** : is de hoeveelheid teststof die wordt toegediend. De dosis wordt uitgedrukt in gewicht (g, mg) of in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (bv. mg/kg), of als constante voedingsconcentraties (ppm).

**Dosering** : is een algemene term die de dosis alsook de frequentie daarvan en de doseringsperiode omvat.

**NOAEL** : is de afkorting voor het niveau zonder waarneembaar schadelijk effect en is de hoogste dosis waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

## 1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

## 1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

### 1.4.1 Voorbereiding van de dieren

Voor het onderzoek worden gezonde dieren gebruikt die ten minste vijf dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden zijn gehouden als tijdens de test en die niet eerder voor experimenten zijn gebruikt. De proefdieren worden op basis van kenmerken als soort, stam, oorsprong, geslacht, gewicht en/of leeftijd ingedeeld. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De kooien worden zodanig neergezet dat mogelijke effecten door de plaatsing daarvan tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer.

### 1.4.2 Voorbereiding van de doses

De teststof kan via een maagsonde, met de voeding of met het drinkwater worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysisch-chemische eigenschappen van het testmateriaal.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om in eerste instantie een oplossing/suspensie in water te overwegen. Als dit niet mogelijk is, kan een oplossing/emulsie in achtereenvolgens plantaardige olie (bv. maisolie) of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof tijdens de toediening moet worden vastgesteld.

### 1.4.3 Proefomstandigheden

#### 1.4.3.1 Proefdieren

De voorkeur wordt gegeven aan ratten, maar er kunnen ook andere soorten knaagdieren worden gebruikt, bijvoorbeeld muizen. De proef dient te worden uitgevoerd met stammen van gezonde, jonge volgroeide dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. De toediening moet zo snel mogelijk na het spenen beginnen maar in ieder geval voordat de dieren negen weken oud zijn. Per geslacht mag bij het begin van het onderzoek het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer

dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie van een langdurig chronische-toxiciteitsonderzoek, moeten dieren van dezelfde stam en oorsprong voor beide onderzoeken worden gebruikt.

#### 1.4.3.2 Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 20 dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Op basis van de aanwezige kennis van de chemische stof of een stof die daar veel op lijkt, verdient het overweging een extra satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) op te nemen in de controlegroep en in de groep met het hoogste dosisniveau, om na de behandeling te kunnen nagaan of er sprake is van reversibiliteit of persistentie van eventuele toxische effecten. De duur van deze nabehandelperiode moet worden vastgesteld in overeenstemming met de waargenomen effecten.

#### 1.4.3.3 Dosisniveaus

Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie 1.4.3.4). De dosisniveaus kunnen gebaseerd zijn op de resultaten van onderzoeken met herhaalde toediening of van verkennende onderzoeken, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante materialen beschikbaar zijn. Indien er geen beperkingen vanwege de fysisch-chemische aard of de biologische effecten van de teststof zijn, moet het hoogste dosisniveau worden gekozen om toxiciteit te veroorzaken, maar niet de dood of ernstige pijn. Er moet een afnemende reeks dosisniveaus worden gekozen om elke doseringsgerelateerde respons en een niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau aan te tonen. Doorgaans zijn twee- tot viervoudige intervallen optimaal voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van 6 à 10) tussen twee doseringen.

De controlegroep moet een onbehandelde groep of een mediumcontrolegroep zijn, voorzover een medium wordt gebruikt voor de toediening van de teststof. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Indien een medium wordt gebruikt, moet het medium aan de controlegroep in het voor de proef maximaal gebruikte volume worden toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en een geringere voedingsopname veroorzaakt, kan een paargevoede controlegroep nuttig zijn om onderscheid te maken tussen een vermindering vanwege de eetbaarheid of vanwege toxicologische veranderingen in het testmodel.

Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is : effecten op de absorptie, distributie, metabolisme of retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische karakteristieken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren.

#### 1.4.3.4 Limiettest

Indien een test bij een dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en met gebruikmaking van de procedures die voor deze studie worden beschreven, een niveau zonder schadelijk effect oplevert en indien toxiciteit op grond van informatie over qua samenstelling aanverwante stoffen niet te verwachten is, hoeft wellicht niet het uitvoeren van een volledig onderzoek met gebruikmaking van drie doseringsniveaus overwogen te worden. De limiettest moet worden uitgevoerd tenzij het blootstellingsniveau van de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

## 1.5 PROCEDURE

### 1.5.1 Toediening van de doses

De dieren krijgen gedurende een periode van 90 dagen, 7 dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Voor elk ander doseringsinterval, bv. vijf dagen per week, moet een goede reden zijn. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het maximale volume dat voor de proef wordt gebruikt, mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water, waarvan het volume maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht mag bedragen. Afgezien van irriterende of bijtende stoffen die normaliter bij hogere concentraties ergere effecten vertonen, moet de variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een onderzoek gedurende een periode van 90 dagen wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

### 1.5.2 Waarnemingen

De observatieperiode moet ten minste 90 dagen duren. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog gedurende een gepaste periode zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na de toediening van de dosis. De klinische conditie van de dieren moet geregistreerd worden. Ten minste tweemaal per dag, normaliter aan het begin en eind van elke dag, moeten alle dieren worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte.

Ten minste eenmaal vóór de eerste blootstelling (om vergelijkingen op hetzelfde gebied te kunnen trekken) en eenmalig een week daarna moeten alle dieren aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. De gegevens moeten zorgvuldig geregistreerd worden, bij voorkeur met behulp van scoringsystemen die door het proeflaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet getracht worden verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Er dient onder meer te worden gelet op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, het voorkomen van secreties en excreties, en autonome activiteiten (bv. tranenvloed, pilo-erectie, pupilgrootte, abnormaal ademhalingspatroon). Ook veranderingen in de manier van lopen, de houding en de reactie op de behandeling alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotypen (bv. abnormaal poetsgedrag, blijven ronddraaien) of bizar gedrag (bv. zelfverminking, achteruit lopen) moeten geregistreerd worden (1).

Vóór de toediening van de teststof en na beëindiging van het onderzoek wordt een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een even geschikt apparaat. Dit onderzoek wordt bij voorkeur op alle dieren verricht, maar ten minste op die in de groepen met het hoge dosisniveau en in de controlegroepen. Wanneer oogafwijkingen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

Tegen het einde van de blootstellingsperiode maar in geen geval vóór de elfde week moeten onderzoeken naar de sensorische reacties op verschillende soorten stimuli (1) (bv. auditieve, visuele en proprioceptieve stimuli) (2), (3), (4), alsmede een bepaling van de grijpkracht (5) en van de motorische activiteit (6) worden verricht. Meer informatie over de procedures die kunnen worden gevolgd, is te vinden in de desbetreffende literatuur. Er kunnen evenwel ook andere dan de genoemde procedures worden toegepast.

De uitvoering van functionele waarnemingen tegen het eind van het onderzoek kan achterwege worden gelaten indien andere onderzoeken al gegevens over functionele waarnemingen hebben opgeleverd en uit de dagelijkse klinische waarnemingen geen functionele gebreken zijn gebleken.

In uitzonderingsgevallen kunnen functionele waarnemingen ook achterwege worden gelaten bij groepen die anders tekenen van toxiciteit vertonen in een mate die aanzienlijk zou interfereren met de uitvoering van de functionele test.

#### 1.5.2.1 Lichaamsgewicht en voedsel-/waterverbruik

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Het meten van het waterverbruik kan ook worden overwogen bij voedsel- of maagsondeonderzoeken, gedurende welke de drinkactiviteit kan veranderen.

#### 1.5.2.2 Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen

Van een bepaalde plek moeten bloedmonsters worden genomen die, voorzover van toepassing, onder gepaste omstandigheden bewaard moeten worden. Aan het einde van de testperiode moeten de monsters worden genomen vlak vóór het doden van de dieren of als onderdeel van de dodingsprocedure.

Aan het einde van de testperiode en indien tussentijds bloedmonsters zijn genomen, moeten de volgende hematologische onderzoeken worden verricht : bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van een maat voor het stollingsvermogen.



Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nier en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op de bloedmonsters die van elk dier zijn genomen vlak vóór het doden daarvan of als onderdeel van de dodingsprocedure (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren). Op dezelfde wijze als bij de hematologische onderzoeken kunnen tussentijds bloedmonsters worden genomen ten behoeve van klinisch-biochemische tests. Het is aan te bevelen in de nacht voordat de bloedmonsters worden genomen de dieren voedsel te onthouden <sup>(1)</sup>. Bepalingen in plasma of serum moeten het volgende omvatten : natrium, kalium, glucose, totaal cholesterol, ureum, bloedureum, stikstof, creatinine, totaal eiwit en albumine, en meer dan twee enzymen die symptomatisch zijn voor hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, alkalinefosfatase, gammaglutamyltranspeptidase en sorbitoldehydrogenase). Er kunnen ook metingen worden verricht van extra enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en galzuren, die onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie kunnen opleveren.

Als optie kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek de volgende urineonderzoeken worden verricht, waarbij op regelmatige tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen : uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen.

Bovendien moet worden overwogen serummarkers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere bepalingen die uitgevoerd moeten worden wanneer de bekende eigenschappen van de teststof invloed hebben of kunnen hebben op de bijbehorende metabolische profielen : calcium, fosfor, triglyceriden bij nuchtere toestand, bepaalde hormonen, methemoglobine en cholinesterase-activiteit. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

Algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van de diersoorten en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

Wanneer historische basisgegevens ontoereikend zijn, moet worden overwogen of het noodzakelijk is vóór aanvang van de toediening hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen; het is algemeen niet aan te bevelen deze gegevens vóór de behandeling te genereren (7).

#### 1.5.2.3 *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijnieren, testes, epididymides, uterus, ovaria, thymus, milt, hersenen en het hart van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

De volgende weefsels moeten in een medium worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is : elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (alle relevante delen, waaronder cerebrum, cerebellum en merg/brug), ruggenmerg (op drie niveaus : cervicaal, middenthoracaal en lumbaal), hypofyse, schildklier, bijschildklier, thymus, slokdarm, speekselklieren, maag, dunne en dikke darmen (met in begrip van de eilandjes van Peyer), lever, alvleesklier, nieren, bijnieren, milt, hart, luchtpijp en longen (behandeling door opblazen met een fixatief en vervolgens onderdompelen), aorta, geslachtsklieren, uterus, bijbehorende geslachtsorganen, borstklieren van wijfjes, prostaat, urineblaas, galblaas (muizen), lymfklieren (bij voorkeur één lymfklier op de toedieningsroute en één op een afstand van de toedieningsroute om systemische effecten op te vangen), perifere zenuw (grote beenzenuw of scheenbeen) bij voorkeur zeer dicht bij de spier, een beenmergsectie (en/of een vers beenmergspiraat), huid en ogen (indien tijdens de oftalmologische onderzoeken veranderingen werden waargenomen). Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard.

#### 1.5.2.4 *Histopathologisch onderzoek*

Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden.

Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens voor iedere testgroep worden verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien : het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren dat beschadigingen vertoont, de aard van de beschadigingen en het percentage dieren dat elk type beschadiging vertoont.

Voorzover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

**2.2 VERSLAG VAN HET ONDERZOEK**

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

**2.2.1 Teststof :**

- fysieke aard, zuiverheid en fysico-chemische eigenschappen;
- identificatiegegevens;
- medium (waar van toepassing) : rechtvaardiging van het gekozen medium wanneer dat geen water is.

**2.2.2 Diersoort :**

- gebruikte diersoort en stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- gewicht van elk dier aan het begin van de proef.

**2.2.3 Proefomstandigheden :**

- redenen voor de keuze van het dosisniveau;
- details over de samenstelling van de teststof en voedselbereiding, gerealiseerde concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- details over de toediening van de teststof;
- toegepaste, werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voorzover van toepassing;
- details over de kwaliteit van het voedsel en drinkwater.

**2.2.4 Resultaten :**

- lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;
- waar van toepassing voedselverbruik en waterverbruik;
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis, inclusief toxiciteitsverschijnselen;
- aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (al dan niet reversibel);
- uitgevoerd oftalmologisch onderzoek;
- bepalingen van de activiteit van de zintuigen, de grijpkracht en de motorische activiteit (indien beschikbaar);
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten;
- lichaamsgewicht, orgaangewichten en verhoudingen lichaam-/orgaangewicht van gestorven dieren;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- indien beschikbaar absorptiegegevens;
- waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

**3. REFERENTIES**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery : Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, pp. 267-283.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, pp. 233-236.
- (6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments : Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, pp. 599-609.
- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, pp. 198-201.

---

Nota's

(<sup>1</sup>) Voor een aantal metingen serum en plasma, met name voor glucose, is het aan te bevelen de nacht ervoor de dieren voedsel te onthouden. De belangrijkste reden hiervoor is dat de verhoogde variabiliteit die onvermijdelijk voortvloeit uit het nuttigen van voedsel, ertoe zou leiden dat subtielere effecten verborgen en de interpretatie moeilijker zou worden. Aan de andere kant kan het 's nachts onthouden van voedsel echter interfereren met het algemene metabolisme van de dieren en, met namen in voedingsonderzoeken, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoren. Indien ervoor wordt gekozen 's nachts voedsel te onthouden, moeten de klinischbiochemische bepalingen worden uitgevoerd na de functionele waarnemingen van het onderzoek.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

## Bijlage IC

**B.27. SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST****TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP DIEREN ANDERS DAN KNAAGDIEREN  
BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)****1. METHODE**

De methode die voor deze subchronische orale toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 409 (1998).

**1.1 INLEIDING**

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests of toxiciteitstests met herhaalde toediening (28 dagen) eerste informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de subchronische orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Het onderzoek van 90 dagen levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een periode van snelle groei tot aan de jonge volgroeiheid. Het onderzoek zal informatie opleveren over de belangrijkste toxische effecten, er zullen organen die beschadigd kunnen worden en de mogelijkheid van accumulatie worden aangegeven, en er kan een inschatting worden gemaakt van een blootstellingsniveau zonder schadelijk effect, dat kan worden gebruikt bij de keuze van dosisniveaus voor chronische onderzoeken en voor de vaststelling van veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens.

Met de testmethode kunnen negatieve effecten van blootstelling aan een chemische stof bij diersoorten anders dan knaagdieren worden geïdentificeerd. De test wordt uitsluitend gebruikt :

- indien uit effecten die in andere studies zijn vastgesteld, blijkt dat er behoefte is aan verduidelijking/karakterisering in een tweede diersoort anders dan knaagdieren;
- indien uit toxicokinetische studies blijkt dat het gebruik van een specifieke diersoort anders dan knaagdieren de beste keuze als proefdier is, of
- indien andere specifieke redenen het gebruik van diersoorten anders dan knaagdieren rechtvaardigen.

Zie ook algemene inleiding deel B.

**1.2 DEFINITIES**

Dosis : is de hoeveelheid teststof die wordt toegediend. De dosis wordt uitgedrukt in gewicht (g, mg) of in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (bv. mg/kg), of als constante voedingsconcentraties (ppm).

Dosering : is een algemene term die de dosis alsook de frequentie daarvan en de doseringsperiode omvat.

NOAEL : is de afkorting voor het niveau zonder waarneembaar schadelijk effect en is de hoogste dosis waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

**1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE**

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

**1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE****1.4.1 Keuze van de diersoort**

De meest gebruikte diersoort anders dan knaagdieren is de hond, die van een bepaald ras moet zijn; de beagle wordt in dit verband vaak gebruikt. Ook andere diersoorten, bv. zwijnen en minivarkens, kunnen gebruikt worden. Primaten zijn niet aan te bevelen en voor het gebruik daarvan moeten goede redenen zijn. Er moeten jonge, gezonde dieren worden gebruikt. In het geval van honden moet met de toediening van de dosis bij voorkeur worden begonnen als de honden 4-6 maanden maar in geen geval meer dan 9 maanden oud zijn. Indien het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moeten dieren van dezelfde soort/ras voor beide onderzoeken worden gebruikt.

**1.4.2 Voorbereiding van de dieren**

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren gebruikt die onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden zijn gehouden als tijdens de test en die niet eerder voor experimenten zijn gebruikt. De duur van de acclimatisering hangt af van de gekozen diersoort en de oorsprong daarvan. In dit verband gelden de volgende aanbevelingen : ten minste vijf dagen voor honden of voor dit doel speciaal gefokte varkens uit een eigen kolonie en ten minste twee weken als deze dieren van externe oorsprong zijn. De proefdieren worden op basis van kenmerken als soort, stam, oorsprong, geslacht, gewicht en/of leeftijd ingedeeld. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De kooien worden zodanig neergezet dat mogelijke effecten door de plaatsing daarvan tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer.

**1.4.3 Voorbereiding van de doses**

De teststof kan met de voeding, met het drinkwater, via een maagsonde of in capsules worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysisch-chemische eigenschappen van het testmateriaal.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenseerd. Het verdient aanbeveling om in eerste instantie een oplossing/suspensie in water te overwegen. Als dit niet mogelijk is, kan een oplossing/emulsie in achtereenvolgens plantaardige olie (bv. maisolie) of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof tijdens de toediening moet worden vastgesteld.

**1.5 PROCEDURE****1.5.1 Aantal en geslacht van de dieren**

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste acht dieren (vier wijfjes en vier mannetjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Aan het einde van het onderzoek moeten voldoende dieren overblijven om een zinvolle evaluatie van de toxische effecten mogelijk te maken. Op basis van de aanwezige kennis van de chemische stof of een stof die daar veel op lijkt, verdient het overwegen een extra satellietgroep van acht dieren (vier per geslacht) op te nemen in de controlegroep en in de groep met het hoogste dosisniveau, om na de behandeling te kunnen nagaan of er sprake is van reversibiliteit of persistentie van eventuele toxische effecten. De duur van deze nabehandelperiode moet worden vastgesteld in overeenstemming met de waargenomen effecten.

### 1.5.2 Dosisniveaus

Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie 1.5.3). De dosisniveaus kunnen gebaseerd zijn op de resultaten van onderzoeken met herhaalde toediening of van verkennende onderzoeken, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante materialen beschikbaar zijn. Indien er geen beperkingen vanwege de fysisch-chemische aard of de biologische effecten van de teststof zijn, moet het hoogste dosisniveau worden gekozen om toxiciteit te veroorzaken, maar niet de dood of ernstige pijn. Er moet een afnemende reeks dosisniveaus worden gekozen om elke doseringsgerelateerde respons en een niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau aan te tonen. Doorgaans zijn twee- tot viervoudige intervallen optimaal voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van 6 à 10) tussen twee doseringen.

De controlegroep moet een onbehandelde groep of een mediumcontrolegroep zijn, voorzover een medium wordt gebruikt voor de toediening van de teststof. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Indien een medium wordt gebruikt, moet het medium aan de controlegroep in het voor de proef maximaal gebruikte volume worden toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en een geringere voedingsopname veroorzaakt, kan een paargevoede controlegroep nuttig zijn om onderscheid te maken tussen een vermindering vanwege de eetbaarheid of vanwege toxicologische veranderingen in het testmodel.

Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is : effecten op de absorptie, distributie, metabolisme of retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische karakteristieken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren.

### 1.5.3 Limiettest

Indien een test bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en met gebruikmaking van de procedures die voor deze studie worden beschreven, een niveau zonder schadelijk effect oplevert en indien toxiciteit op grond van informatie over qua samenstelling aanverwante stoffen niet te verwachten is, hoeft wellicht niet het uitvoeren van een volledig onderzoek met gebruikmaking van drie doseringsniveaus overwogen te worden. De limiettest moet worden uitgevoerd tenzij het blootstellingsniveau van de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

### 1.5.4 Toediening van de doses

De dieren krijgen gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Voor elk ander doseringsinterval, bv. vijf dagen per week, moet een goede reden zijn. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Normaliter moet het volume zo laag mogelijk worden gehouden. Afgezien van irriterende of bijtende stoffen die normaliter bij hogere concentraties ergere effecten vertonen, moet de variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een onderzoek gedurende een periode van 90 dagen wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

### 1.5.5 Waarnemingen

De observatieperiode moet ten minste 90 dagen duren. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog gedurende een gepaste periode zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na de toediening van de dosis. De klinische conditie van de dieren moet geregistreerd worden. Ten minste tweemaal per dag, normaliter aan het begin en eind van elke dag, moeten alle dieren worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte.

Ten minste eenmaal vóór de eerste blootstelling (om vergelijkingen op hetzelfde gebied te kunnen trekken) en eenmalig een week daarna moeten alle dieren aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. Er moet getracht worden verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Alle waargenomen toxiciteitsverschijnselen moeten zorgvuldig worden geregistreerd, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst ervan. Er dient onder meer te worden gelet op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, het voorkomen van secreties en excreties, en autonome activiteiten (bv. tranenvloed, pilo-erectie, pupilgrootte, abnormaal ademhalingspatroon). Ook veranderingen in de manier van lopen, de houding en de reactie op de behandeling alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotypen (bv. abnormaal poetsgedrag, blijven rondraaien) of bizar gedrag moeten geregistreerd worden.

Vóór de toediening van de teststof en na beëindiging van het onderzoek wordt een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een even geschikt apparaat. Dit onderzoek wordt bij voorkeur op alle dieren verricht, maar ten minste op die in de groepen met het hoge dosisniveau en in de controlegroepen. Wanneer oogafwijkingen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.



#### 1.5.5.1 *Lichaamsgewicht en voedsel-/waterverbruik*

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Het meten van het waterverbruik kan ook worden overwogen bij voedsel- of maagsondeonderzoeken, gedurende welke de drinkactiviteit kan veranderen.

#### 1.5.5.2 *Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen*

Van een bepaalde plek moeten bloedmonsters worden genomen die, voorzover van toepassing, onder gepaste omstandigheden bewaard moeten worden. Aan het einde van de testperiode moeten de monsters worden genomen vlak vóór het doden van de dieren of als onderdeel van de dodingsprocedure.

Aan het begin van de testperiode moeten de volgende hematologische onderzoeken worden verricht : bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van een maat voor het stollingsvermogen, zoals prothrombinetijd of thromboplastinetijd. Deze onderzoeken moeten vervolgens om de maand of halverwege de testperiode en ten slotte aan het einde van de test worden herhaald.

Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nier en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op bloedmonsters die van elk dier worden genomen aan het begin van de testperiode, om de maand of halverwege de test en ten slotte aan het einde van de testperiode. Tot de testgebieden die overwogen moeten worden, behoren elektrolytisch evenwicht, koolhydraatstofwisseling en de lever- en nierwerking. De keuze van specifieke tests wordt beïnvloed door waarnemingen van de werking van de teststof. Vóór het nemen van de bloedmonsters moet de dieren gedurende een voor die diersoort gepaste periode voedsel worden onthouden. Tot de aanbevolen onderzoeken behoren de meting van calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucose bij nuchtere toestand, alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, ornithinecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumewit.

Ten minste aan het begin, vervolgens halverwege en ten slotte aan het einde van de studie moeten urineonderzoeken worden verricht, waarbij de urinemonsters op regelmatige tijdstippen genomen moeten worden. Het volgende moet worden onderzocht : uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen. Wanneer nodig kunnen hieraan nog parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten te verlengen.

Bovendien moet worden overwogen markers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere bepalingen die nodig kunnen zijn voor een adequate toxicologische evaluatie zijn : analyse van lipiden, hormonen, het zuur-base-evenwicht, methemoglobine en cholinesteraseremming. Wanneer nodig kunnen hieraan nog klinisch-chemische parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten te verlengen. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

Algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van de diersoort en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

#### 1.5.5.3 *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijnieren, testes, epididymides, uterus, ovaria, thymus, milt, hersenen en het hart van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

De volgende weefsels moeten in een medium worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is : elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (alle relevante delen, waaronder cerebrum, cerebellum en merg/brug), ruggenmerg (op drie niveaus : cervicaal, middenthoracaal en lumbaal), hypofyse, ogen, schildklier, bijschildklier, thymus, slokdarm, speekselklieren, maag, dunne en dikke darmen (met in begrip van de eilandjes van Peyer), lever, galblaas, alvleesklier, nieren, bijnieren, milt, hart, luchtpijp en longen, aorta, geslachtsklieren, uterus, bijbehorende geslachtsorganen, borstklieren van wijfjes, prostaat, urineblaas, lymfklieren (bij voorkeur één lymfklier op de toedieningsroute en één op een afstand van de toedieningsroute om systemische effecten op te vangen), perifere zenuw (grote beenzenuw of scheenbeen) bij voorkeur zeer dicht bij de spier, een beenmergsectie (en/of een vers beenmergaspiraet) en huid. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard.

#### 1.5.5.4 *Histopathologisch onderzoek*

Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden.

Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens voor iedere testgroep worden verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien : het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren dat beschadigingen vertoont, de aard van de beschadigingen en het percentage dieren dat elk type beschadiging vertoont.

Voorzover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

### 2.2 VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

#### 2.2.1 Teststof

- fysieke aard, zuiverheid en fysico-chemische eigenschappen;
- identificatiegegevens;
- medium (waar van toepassing) : rechtvaardiging van het gekozen medium wanneer dat geen water is.

#### 2.2.2 Diersoort

- gebruikte diersoort en stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;
- gewicht van elk dier aan het begin van de proef.

#### 2.2.3 Proefomstandigheden

- redenen voor de keuze van het dosisniveau;
- details over de samenstelling van de teststof en voedselbereiding, gerealiseerde concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- details over de toediening van de teststof;
- toegepaste, werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voorzover van toepassing;
- details over de kwaliteit van het voedsel en het drinkwater.

#### 2.2.4 Resultaten

- lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;
- waar van toepassing voedselverbruik en waterverbruik;
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis, inclusief toxiciteitsverschijnselen;
- aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (al dan niet reversibel);
- uitgevoerd oftalmologisch onderzoek;
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten;
- lichaamsgewicht, orgaangewichten en verhoudingen lichaam-/orgaangewicht van gestorven dieren;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- indien beschikbaar absorptiegegevens;
- waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten;

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

## Bijlage ID

## C.14. GROEITEST ONVOLWASSEN VISSSEN

## 1. METHODE

Deze groei-toxiciteitstest is overgenomen van OESO TG 215 (2000).

## 1.1 INLEIDING

Het doel van deze test is het beoordelen van de effecten van een langdurige blootstelling aan chemische stoffen op de groei van onvolwassen vissen. De test is gebaseerd op een methode, die binnen de Europese Unie is ontwikkeld en getest met de rondzendproef (1)(3), voor het beoordelen van de effecten van chemische stoffen op de groei van onvolwassen regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) in een doorstroomprocedure. Voor deze test mogen ook andere goed gedocumenteerde vissoorten worden gebruikt. In het verleden zijn bijvoorbeeld al eens groeitests uitgevoerd met zebrafissen (*Danio rerio*) (2)(4)(5) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes*) (6)(7)(8).

Zie ook Algemene inleiding, deel C.

## 1.2 DEFINITIES

**Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)** : de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant effect ( $p < 0,05$ ) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter is dan de LOEC.

**No Observed Effect Concentration (NOEC)** : de testconcentratie direct onder de LOEC.

**EC<sub>x</sub>** : bij deze testmethode de concentratie van de teststof die x % variatie in de groeisnelheid van de vissen veroorzaakt vergeleken met de controlegroepen.

**Densiteit** : het natte gewicht van de vissen per volume water.

**Bezettingsgraad** : het aantal vissen per volume water.

**Specifieke groeisnelheid van de afzonderlijke vissen** : de groeisnelheid van één afzonderlijke vis met als uitgangspunt het begingewicht.

**Gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak** : de gemiddelde groeisnelheid van een bakpopulatie bij een bepaalde concentratie.

**Pseudo-specifieke groeisnelheid** : de afzonderlijke groeisnelheid van de vissen vergeleken met het gemiddelde begingewicht van de bakpopulatie.

## 1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Onvolwassen vissen in exponentiële groeifasen worden, nadat ze zijn gewogen, in testkamers geplaatst en blootgesteld aan een reeks subletale concentraties van de teststof die is opgelost in water. Hierbij moet bij voorkeur de doorstroomprocedure worden gebruikt. Als dit niet mogelijk is, moet een geschikte semi-statische procedure (statisch-versersing) worden gebruikt. De test duurt 28 dagen. De vissen worden dagelijks gevoerd. Het voedsel-rantsoen is afhankelijk van het begingewicht van de vissen en kan indien gewenst na 14 dagen opnieuw worden berekend. Na afloop van de test worden de vissen opnieuw gewogen. De effecten op de groeisnelheid worden geanalyseerd met een regressiemodel, zodat kan worden geraamd welke concentratie x % variatie in de groeisnelheid kan veroorzaken, d.w.z. EC<sub>x</sub> (bijvoorbeeld EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> of EC<sub>30</sub>). De gegevens kunnen ook worden vergeleken met de controlewaarden, zodat de LOEC en NOEC kunnen worden bepaald.

## 1.4 GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Resultaten van een acute toxiciteitstest (zie methode C. 1), bij voorkeur met dezelfde vissoort als in deze test is gebruikt, moeten beschikbaar zijn. Dit betekent dat de oplosbaarheid in water en de dampspanning van de teststof bekend moeten zijn en dat er een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar is voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

Nuttige gegevens over de teststof zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in water en licht, pK<sub>a</sub>, P<sub>ow</sub> en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C. 4).

## 1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

De test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan :

- het sterftecijfer in de controlegroep(en) mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 10 %;
- het gemiddelde gewicht van vissen in de controlegroep(en) moet zodanig zijn toegenomen dat de minimumvariatie in groeisnelheid die als significant wordt beschouwd, kan worden gedetecteerd. Een rondzendproef (3) heeft aangetoond dat bij regenboogforel het gemiddelde gewicht van vissen in de controlegroepen binnen 28 dagen met minimaal de helft (d.w.z. 50 %) van hun gemiddelde begingewicht moet zijn toegenomen. Bijvoorbeeld : begingewicht 1 g/vis (= 100 %), eindgewicht na 28 dagen :  $\geq 1,5$  g/vis ( $\geq 150$  %);
- het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test minimaal 60 % van de verzadigingswaarde van lucht zijn geweest;
- het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Tevens mag de watertemperatuur niet meer dan  $2^\circ\text{C}$  hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangel 1).

## 1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

## 1.6.1 Apparatuur

Standaard-laboratoriumapparatuur, met name :

- a) zuurstof- en pH-meters;
- b) apparatuur voor het bepalen van de hardheid en alkaliteit van water;
- c) geschikte apparatuur voor de temperatuurregeling en bij voorkeur ook voor continue bewaking;
- d) bakken van chemisch inert materiaal met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad (zie punt 1.8.5 en aanhangsel 1);
- e) weegschaal met een toereikende nauwkeurigheid (d.w.z. nauwkeurig tot op  $\pm 0,5$  %).

### 1.6.2 Water

Water waarin de gekozen testsoort langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater. Gedurende de test moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde moet binnen een bereik van 6,5 en 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan  $\pm 0,5$  pH-eenheden schommelen. De aanbevolen hardheid is 140 mg/l ( $\text{CaCO}_3$ ) of hoger. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof), moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl en  $\text{SO}_4$ ), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar. In aanhangsel 2 worden enkele chemische kenmerken van geschikt verdunningswater genoemd.

### 1.6.3 Testoplossingen

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing.

De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt.

Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (ontsluitingsmiddelen) kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van passende oplosmiddelen zijn aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van passende dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. Als gemakkelijk biologisch afbreekbare agentia (bijvoorbeeld aceton) en/of zeer vluchtige stoffen worden gebruikt, moet worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in de doorstroomtests kunnen voordoen. Indien wordt gebruikgemaakt van een ontsluitingsmiddel, mag dit geen grote invloed hebben op de groei en geen zichtbaar negatief effect hebben op de onvolwassen vissen, hetgeen blijkt uit de controlegroep met uitsluitend oplosmiddel.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Met een rondzendproef (3) is aangetoond dat, bij regenboogforel, een verversingsfrequentie tijdens de test van 6 liter/g vis per dag acceptabel is (zie punt 1.8.2.2).

Bij semi-statische (verversings)tests hangt de verversingsfrequentie af van de stabiliteit van de teststof, maar dagelijks verversen van water wordt aanbevolen. Als uit eerdere stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de verversingsperiode niet stabiel blijft (d.w.z. buiten 80-120 % van de nominale concentratie valt of onder 80 % van de gemeten oorspronkelijke concentratie), moet worden overwogen om over te gaan op een doorstroomtest.

### 1.6.4 Keuze van de vissoort

Voor deze test wordt de regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) aanbevolen omdat hiermee met de rondzendproef de meeste ervaring is opgedaan (1)(3). Andere goed gedocumenteerde vissoorten mogen ook worden gebruikt, maar de testprocedure moet wellicht worden aangepast teneinde passende testomstandigheden te creëren. In het verleden is bijvoorbeeld ook ervaring opgedaan met zebravissen (*Danio rerio*) (4)(5) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes*) (6)(7)(8). Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

### 1.6.5 Leefomstandigheden van de vis

De testvissen worden geselecteerd uit een populatie van één stam, bij voorkeur van hetzelfde broedsel, dat bij het begin van de test minimaal twee weken oud is en in leven gehouden is onder omstandigheden die qua waterkwaliteit en verlichting overeenkomen met die tijdens de test. Voor de gehele duur van hun verblijf en van de test moeten ze per dag een rantsoen van minimaal 2 % en bij voorkeur 4 % van hun lichaamsgewicht toegediend krijgen.

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt het sterftecijfer geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast :

- sterftecijfer van meer dan 10 % van de populatie binnen zeven dagen : de gehele partij afkeuren;
- sterftecijfer tussen 5 % en 10 % van de populatie : zeven dagen extra voor de aanpassing; als het sterftecijfer gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, de gehele partij afkeuren;
- sterftecijfer van minder dan 5 % van de populatie binnen zeven dagen : de gehele partij accepteren.

De vissen mogen in de twee weken voorafgaande aan de test of tijdens de test niet worden behandeld voor ziekten.

### 1.7 TESTOPZET

De « testopzet » heeft betrekking op het aantal testconcentraties en de factor waarmee ze van elkaar verschillen, het aantal bakken per concentratieniveau en het aantal vissen per bak. Idealiter moet bij de keuze van de testopzet rekening worden gehouden met :

- a) het doel van het onderzoek;
- b) de methode van statistische analyse die wordt toegepast;
- c) de beschikbaarheid en kosten van experimentele middelen.

De omschrijving van het doel van het onderzoek moet, indien mogelijk, de statistische power specificeren waarbij een bepaald verschil (bijvoorbeeld in groeisnelheid) moet worden gedetecteerd, of de nauwkeurigheid specificeren waarmee de  $\text{EC}_x$  (bijvoorbeeld met  $x = 10, 20$  of  $30$ , en bij voorkeur niet minder dan  $10$ ) moet worden geraamd. Zonder deze gegevens kan geen goede omschrijving worden gegeven van de omvang van het onderzoek.

Het is belangrijk om te onderkennen dat een opzet die optimaal is (optimaal gebruik van de middelen) voor toepassing bij één methode voor statistische analyse, niet per definitie ook optimaal is voor een andere. De aanbevolen opzet voor de raming van een LOEC/NOEC is daardoor niet dezelfde als de opzet die wordt aanbevolen voor regressieanalyse.

In de meeste gevallen verdient regressieanalyse de voorkeur boven de variantieanalyse. De redenen daarvoor worden uiteengezet door Stephan en Rogers (9). Als er echter geen geschikt regressiemodel wordt gevonden ( $r^2 < 0,9$ ), moet NOEC/LOEC worden gebruikt.



### 1.7.1 Opzet voor regressieanalyse

De belangrijke overwegingen bij het opzetten van een test die door middel van regressie wordt geanalyseerd, zijn :

a) De effectconcentratie (bijvoorbeeld EC<sub>10,20,30</sub>) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, moeten altijd begrepen zijn onder de concentraties die in de test worden gebruikt. De nauwkeurigheid waarmee de effectconcentraties kunnen worden geraamd, is optimaal wanneer de effectconcentratie zich in het midden bevindt van het bereik van geteste concentraties. Een voorbereidende test voor het vaststellen van het bereik kan nuttig zijn bij het selecteren van de juiste testconcentraties.

b) Teneinde een goed statistisch model te verkrijgen, moet de test minimaal één bak met een controlegroep omvatten en vijf extra bakken met verschillende concentraties. Wanneer gebruik wordt gemaakt van een ontsluitingsmiddel, moet er naast de testreeks een controlegroep worden behandeld met de hoogste testconcentratie ontsluitingsmiddel (zie punt 1.8.3 en 1.8.4).

c) Er mag worden gebruikgemaakt van een geschikte geometrische reeks of logaritmische reeks (10) (zie aanhangsel 3). De verdeling van de testconcentraties moet bij voorkeur logaritmisch zijn.

d) Als er meer dan zes bakken beschikbaar zijn, moeten de extra bakken worden gebruikt als replicaatbakken of worden verdeeld over de reeks concentraties om zodoende een kleiner verschil tussen de niveaus te creëren. Beide mogelijkheden zijn even goed.

### 1.7.2 Opzet voor de raming van een NOEC/LOEC met behulp van ANOVA (variantieanalyse)

Het is wenselijk om voor elke concentratie een replicaatbak te hebben. De statistische analyse moet op bakniveau worden uitgevoerd (11). Zonder replicaatbakken kan, behalve met de variabiliteit die verband houdt met de afzonderlijke vissen, geen rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen de bakken. Bij eerdere onderzoeken is echter gebleken (12) dat de variabiliteit tussen de bakken in een dergelijke test erg klein is vergeleken met de variabiliteit in de bakken (d.w.z. tussen de vissen). Als relatief aanvaardbaar alternatief kan de statistische analyse daarom op het niveau van de afzonderlijke vissen worden uitgevoerd.

Normaliter worden er minimaal vijf testconcentraties in een geometrische reeks met een factor van bij voorkeur ten hoogste 3,2 gebruikt.

Wanneer tests worden uitgevoerd met replicaatbakken, moet het aantal replicaatbakken voor controlegroepen en dus het aantal vissen over het algemeen het dubbele zijn van het aantal in elk van de testconcentraties, die van gelijke omvang moeten zijn (13)(14)(15). Als er geen replicaatbakken zijn, moet het aantal vissen in de controlegroep gelijk zijn aan dat in elke testconcentratie.

Als de ANOVA wordt gebaseerd op bakken in plaats van afzonderlijke vissen (wat zou betekenen dat elke vis afzonderlijk moet worden gemerkt of dat moet worden gebruikgemaakt van pseudo-specifieke groeisnelheden (zie punt 2.1.2)), moeten er voldoende replicaatbakken aanwezig zijn om de standaardafwijking van « bakken met concentraties » te kunnen bepalen. Dit betekent dat de niveaus van fouttolerantie in de variantieanalyse minimaal 5 moeten zijn (11). Als er alleen replicaten worden gemaakt van de controlegroepen, bestaat het risico dat de foutvariabiliteit onzuiver is. Deze kan dan namelijk toenemen met de gemiddelde waarde van de groeisnelheid in kwestie. Omdat de groeisnelheid waarschijnlijk zal afnemen naarmate de concentratie hoger wordt, is het mogelijk dat de variabiliteit wordt overschat.

## 1.8 PROCEDURE

### 1.8.1 Selectie en weging van de testvissen

Het is belangrijk om de variatie in het gewicht van de vissen aan het begin van de test zoveel mogelijk te beperken. In aanhangsel 1 worden geschikte gewichtbereiken aangegeven voor de verschillende vissoorten die worden aanbevolen voor deze test. Voor de gehele partij vissen die in deze test wordt gebruikt, geldt dat het bereik van het afzonderlijke gewicht van de vissen aan het begin van de test idealiter binnen  $\pm 10\%$ , maar maximaal binnen  $25\%$ , van het rekenkundig gemiddelde blijft. Het verdient aanbeveling om voorafgaande aan de test een steekproef te nemen om het gemiddelde gewicht te bepalen.

De stampopulatie mag vanaf 24 uur voor het begin van de test niet worden gevoerd. De vissen moeten vervolgens willekeurig worden geselecteerd. De vissen krijgen een verdovingsmiddel toegediend (bijvoorbeeld een oplossing in water van 100 mg/l tricaine-methaansulfonaat (MS 222) geneutraliseerd met twee delen natriumbicarbonaat per deel MS 222) en worden afzonderlijk in natte toestand gewogen (drooggedept) zoals beschreven in aanhangsel 1. De vissen met een gewicht binnen het juiste bereik, moeten worden behouden en vervolgens willekeurig over de testbakken worden verdeeld. Het totale natte gewicht van alle vissen in een bak moet worden geregistreerd. Het gebruik van verdovingsmiddelen en het behandelen van de vissen (inclusief droogdeppen en wegen) kan stress en verwondingen veroorzaken bij de onvolwassen dieren, met name bij kleine soorten. Onvolwassen vissen moeten daarom uiterst voorzichtig worden behandeld om stress en verwondingen bij deze dieren te voorkomen.

Op dag 28 van de test worden de vissen opnieuw gewogen (zie punt 1.8.6). Als het echter noodzakelijk wordt geacht het rantsoen opnieuw te berekenen, mogen de vissen ook op dag 14 van de test opnieuw worden gewogen (zie punt 1.8.2.3). Er zijn ook andere methoden, zoals de fotografische methode, voor het vaststellen van veranderingen in de visgrootte aan de hand waarvan de rantsoenen kunnen worden aangepast.

### 1.8.2 Blootstellingsomstandigheden

#### 1.8.2.1 Duur

De test duurt  $\geq 28$  dagen.

#### 1.8.2.2 Densiteit en bezettingsgraad

Het is belangrijk dat de densiteit en bezettingsgraad worden afgestemd op de gebruikte vissoort (zie aanhangsel 1). Als de bezettingsgraad te hoog is, zullen de vissen gestrest raken en daardoor minder hard groeien of zelfs ziek worden. Als de bezettingsgraad te laag is, kan territoriumgedrag ontstaan, dat de groei eveneens kan beïnvloeden. In elk geval moet de densiteit zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal  $60\%$  van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden. Een rondzendproef (3) heeft aangetoond dat bij regenboogforel een densiteit van 16 vissen van 3-5 g in een volume van 40 liter acceptabel is. De aanbevolen waterverversingsfrequentie tijdens de test is 6 liter/g vis per dag.

### 1.8.2.3 Voeding

De vissen moeten geschikt voedsel toegediend krijgen (aanhangel 1) in zodanige hoeveelheden dat een acceptabele groeisnelheid wordt bereikt. Bacteriegroei en troebelheid van het water moeten zoveel mogelijk worden voorkomen. Bij regenboogforel wordt waarschijnlijk aan deze voorwaarden voldaan als zij een rantsoen van 4 % van hun lichaamsgewicht per dag krijgen (3)(16)(17)(18). Het dagelijkse rantsoen kan worden verdeeld over twee gelijke porties met een tussenpoos van minimaal 5 uur. Het rantsoen is gebaseerd op het totale gewicht van de vissen in een testbak aan het begin van de test. Als de vissen op dag 14 opnieuw worden gewogen, moet het rantsoen opnieuw worden berekend. De vissen mogen vanaf 24 uur voordat ze worden gewogen, geen voedsel krijgen.

Niet gegeten voedsel en fecaal materiaal moeten dagelijks uit de testbakken worden verwijderd door de bodem van de bakken zorgvuldig schoon te maken met een zuiger.

### 1.8.2.4 Licht en temperatuur

De fotoperiode en watertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (aanhangel 1).

### 1.8.3 Testconcentraties

Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig, ongeacht de testopzet (zie punt 1.7.2). Eerder opgedane kennis over de toxiciteit van de teststof (bijvoorbeeld n.a.v. een acute test en/of onderzoeken voor het vaststellen van het bereik) helpt bij het kiezen van de juiste testconcentraties. Als minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet hiervoor een geldige reden worden gegeven. De hoogste geteste concentratie mag de oplosbaarheidsgrens van de teststof in water niet overschrijden.

Als een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt bij het maken van stamoplossingen, mag de uiteindelijke concentratie hiervan niet groter zijn dan 0,1 ml/l en moet de concentratie bij voorkeur in alle bakken gelijk zijn (zie punt 1.6.3). Het gebruik van deze middelen moet echter te allen tijde zoveel mogelijk worden vermeden.

### 1.8.4 Controlegroepen

Het aantal controlegroepen dat wordt behandeld met verdunningswater hangt af van de testopzet (zie punten 1.7-1.7.2). Als er een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt, moet er een aantal controlegroepen met water waaraan een ontsluitingsmiddel is toegevoegd, worden opgenomen in de test. Dit aantal moet gelijk zijn aan het aantal controlegroepen dat wordt behandeld met verdunningswater.

### 1.8.5 Frequentie van de analytische bepalingen en metingen

Tijdens de test worden de concentraties van de teststoffen regelmatig gemeten (zie hieronder).

Bij doorstroomtests moet de stroomsnelheid van het verdunningswater en de toxische stamoplossing regelmatig worden gecontroleerd, bij voorkeur dagelijks, en mag deze gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Als wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen  $\pm 20\%$  van de nominale waarden blijft (d.w.z. binnen het interval van 80-120 %; zie punt 1.6.2 en 1.6.3), is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit aan het begin van de test en daarna eens per week. Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen  $\pm 20\%$  van de nominale concentratie blijft (op basis van stabiliteitsgegevens van de teststof), moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd. Hierbij moet dezelfde procedure worden gevolgd als hierboven.

Bij semi-statische (verversings)tests waarbij wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen  $\pm 20\%$  van de nominale waarden blijft, is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen, bij het begin van de test en vervolgens eens per week. Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen  $\pm 20\%$  van de nominale concentratie blijft, moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd volgens dezelfde procedure als voor de stabilere stoffen.

Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Als echter kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test binnen  $\pm 20\%$  van de nominale of de gemeten oorspronkelijke concentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op de nominale of gemeten waarden.

Monsters moeten mogelijk worden gefilterd (bijvoorbeeld met een 0,45  $\mu\text{m}$  poriëngrootte) of gecentrifugeerd. Centrifugatie verdient de voorkeur. Als het testmateriaal echter niet aan filters adsorbeert, is filtratie mogelijk een geschikt alternatief.

In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de pH en de temperatuur in alle testbakken worden gemeten. De totale hardheid, alkaliteit en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. Het zuurstofgehalte en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten tijdens de test ten minste drie keer worden gemeten (aan het begin, omstreeks het midden en aan het eind). Bij semi-statische tests is het raadzaam het opgeloste zuurstofgehalte vaker te meten, bij voorkeur voor en na elke waterverversing of minimaal één keer per week. De pH moet bij semi-statische (verversings) tests voor en na elke waterverversing worden gemeten en bij doorstroomtests minimaal één keer per week. De hardheid en alkaliteit moeten per test eenmaal worden gemeten. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testbak continu worden gecontroleerd.

### 1.8.6 Waarnemingen

Gewicht : Aan het eind van de test moet van alle overlevende vissen het natte gewicht (drooggedept) worden gewogen, hetzij per testbak of afzonderlijk. Het gezamenlijk wegen van alle vissen in een testbak verdient de voorkeur boven het afzonderlijk wegen van de vissen waarbij elke vis eerst moet worden gemerkt. Wanneer elke vis apart wordt gewogen om de specifieke groeisnelheid van de afzonderlijke vissen te kunnen bepalen, mag de toegepaste merkmethode geen stress veroorzaken bij de vissen (alternatieven voor koudmerken kunnen wenselijk zijn, bijvoorbeeld het gebruik van een fijne, gekleurde vislijn).

De vissen moeten gedurende de test dagelijks worden onderzocht. Als er een externe afwijking (zoals bloedingen of ontkleuring) of afwijkend gedrag wordt geconstateerd, moet dit worden genoteerd. Ook de sterfte moet worden geregistreerd en de dode vissen moeten zo snel mogelijk worden verwijderd. Dode vissen worden niet vervangen. Als de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad worden aangehouden, wordt namelijk voorkomen dat veranderingen in het aantal vissen per bak de groei beïnvloeden. Het rantsoen moet echter wel worden aangepast.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het is wenselijk om bij de opzet en analyse van de test een statisticus te betrekken omdat de methode een aanzienlijke variatie in de opzet van het experiment toelaat, bijvoorbeeld in het aantal testkamers, het aantal testconcentraties, het aantal vissen, enz. Gezien de beschikbare opties in de opzet van de test, worden hier geen richtlijnen voor de statistische procedures gegeven.

Als het sterftecijfer in een testbak hoger is dan 10 %, mag voor deze bak geen groeisnelheid worden berekend. Wel moet worden gerapporteerd wat het sterftecijfer per testconcentratie is.

Het belangrijkste concept van deze test is het bepalen van de specifieke groeisnelheid  $r$  tussen tijdstip  $t_1$  en tijdstip  $t_2$ , ongeacht de methode die wordt toegepast om de gegevens te analyseren. Deze snelheid kan op verschillende manieren worden gedefinieerd, afhankelijk van het feit of de vissen afzonderlijk gemarkeerd zijn dan wel of er een bakgemiddelde vereist is.

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

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

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

waarbij

$r_1$  = specifieke groeisnelheid van een afzonderlijke vis

$r_2$  = gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak

$r_3$  = pseudo-specifieke groeisnelheid

$w_1, w_2$  = gewicht van een bepaalde vis op het tijdstip  $t_1$  respectievelijk  $t_2$

$\log_e w_1$  = logaritme van het gewicht van een afzonderlijke vis aan het begin van de onderzoeksperiode

$\log_e w_2$  = logaritme van het gewicht van een afzonderlijke vis aan het eind van de onderzoeksperiode

$\overline{\log_e w_1}$  = gemiddelde van de logaritmen van de waarden  $w_1$  voor de vissen in de bak aan het begin van de onderzoeksperiode

$\overline{\log_e w_2}$  = gemiddelde van de logaritmen van de waarden  $w_2$  voor de vissen in de bak aan het eind van de onderzoeksperiode

$t_1, t_2$  = tijd (dag) bij het begin en eind van de onderzoeksperiode

$r_1, r_2, r_3$  kunnen voor de periode van dag 0-28 worden berekend en, indien van toepassing (d.w.z. als op dag 14 metingen zijn uitgevoerd), voor de periode van dag 0-14 en dag 14-28.

#### 2.1.1 Analyse van de resultaten met de regressiemethode (concentratie-reactie-model)

Met deze analysemethode wordt een nuttig rekenkundig verband gelegd tussen de specifieke groeisnelheid en de concentratie, waardoor het mogelijk is de « EC<sub>x</sub> » te ramen, d.w.z. elke willekeurige EC-waarde. Deze analysemethode maakt de berekening van  $r$  voor afzonderlijke vissen ( $r_1$ ) overbodig. In plaats daarvan kan de analyse worden gebaseerd op de gemiddelde waarde van  $r$  per bak ( $r_2$ ). De voorkeur gaat uit naar de laatste methode, mede omdat deze geschikter is voor kleine vissoorten.

De gemiddelde specifieke groeisnelheden per bak ( $r_2$ ) moeten grafisch worden uitgezet tegen de concentratie, zodat de concentratie-reactie-relatie tot uitdrukking komt.

Voor het uitdrukken van de relatie tussen  $r_2$  en de concentratie moet een geschikt model worden gekozen. De keuze moet worden beargumenteerd.

Als elke bak een oneven aantal vissen bevat, moet de passingsprocedure, hetzij eenvoudig of niet-lineair, worden gewogen zodat rekening wordt gehouden met de oneven aantallen.

Met behulp van de passingsmethode voor het model moet een raming gemaakt kunnen worden van bijvoorbeeld de EC<sub>20</sub> en van de bijbehorende dispersie (hetzij standaardafwijking of betrouwbaarheidsinterval). De grafiek van het gepaste model moet worden weergegeven in relatie tot de gegevens zodat de mate waarin het model past, zichtbaar wordt (9)(19)(20)(21).

### 2.1.2 Analyse van de resultaten voor de raming van de LOEC

Als bij de test gebruik is gemaakt van replicaatbakken voor alle concentratieniveaus, kan de LOEC worden geraamd aan de hand van een variantieanalyse (ANOVA) van de gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak (zie punt 2.1), gevolgd door een geschikte methode (bijvoorbeeld de test van Dunnet of Williams (13)(14)(15)(22) voor het vergelijken van de gemiddelde  $r$  voor elke concentratie met de gemiddelde  $r$  van de controlegroepen om de laagste concentratie vast te stellen waarbij dit verschil bij een waarschijnlijkheidsgrens van 0,05 significant is. Als niet wordt voldaan aan de vereiste voorwaarden voor parametermethoden - niet-normale verdeling (bijvoorbeeld de test van Shapiro-Wilk) of heterogene variantie (test van Barlett) - moet worden overwogen om de gegevens te transformeren om varianties te homogeniseren alvorens de ANOVA of een gewogen ANOVA uit te voeren.

Als bij de test niet voor elke concentratie een replicaatbak is gebruikt, zal een ANOVA gebaseerd op bakken ongevoelig of zelfs onmogelijk zijn. In dat geval kan er als tussenoplossing voor worden gekozen de ANOVA te baseren op de pseudo-specifieke groeisnelheid  $r_3$  van afzonderlijke vissen.

De gemiddelde  $r_3$  voor elke testconcentratie kan vervolgens worden vergeleken met de gemiddelde  $r_3$  van de controlegroepen. Vervolgens kan de LOEC op dezelfde manier worden vastgesteld als hierboven is beschreven. Het is belangrijk dat wordt onderkend dat deze methode geen rekening houdt met, of bescherming biedt tegen, variabiliteit tussen de bakken, behalve die welke wordt veroorzaakt door de variabiliteit tussen de afzonderlijke vissen. Bij eerdere onderzoeken is echter gebleken (9) dat de variabiliteit tussen de bakken erg klein is vergeleken met de variabiliteit in de bakken (d.w.z. tussen de vissen onderling). Als de vissen niet afzonderlijk worden geanalyseerd, moet de methode voor het vaststellen van de uitbijter worden vermeld samen met de reden waarom deze methode wordt gebruikt.

### 2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten toxische concentraties in de testoplossingen in de buurt liggen van de detectiegrens van de analysemethode, of, bij semi-statistische tests, als de concentratie van de teststof afneemt in de periode na het bereiden van de oplossing en vóór het verversen.

### 2.3 TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

#### 2.3.1 Teststof

- fysiek voorkomen en relevante fysisch-chemische kenmerken;
- chemische identificatiegegevens, voorzover relevant met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de teststof.

#### 2.3.2 Diersoort

- wetenschappelijke naam, eventueel
- stam, grootte, leverancier, eventuele voorbehandelingen, enz.

#### 2.3.3 Testomstandigheden

- toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statisch/verversing, doorstroom, dichtheid, bezettingsgraad, enz.);
- testopzet (bijvoorbeeld het aantal testbakken, testconcentraties en replicaten, en het aantal vissen per bak);
- wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moet de concentratie daarvan worden vermeld);
- de nominale testconcentraties, de gemiddelden van de in de testbakken gemeten waarden en de standaardafwijkingen, de methode waarmee zij zijn bepaald, en gegevens waaruit blijkt dat de resultaten van de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in de oplossing;
- kenmerken van het verdunningswater : pH, hardheid, alkaliteit, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof, zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;

- waterkwaliteit in de testbakken : pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;
- gedetailleerde gegevens over de voeding (bijvoorbeeld het type voedsel, de leverancier, het rantsoen en de frequentie).

#### 2.3.4 Resultaten

- gegevens waaruit blijkt dat de controlegroepen voldeden aan het validiteitscriterium voor overleving, en gegevens over de sterfte bij de verschillende testconcentraties;
- toegepaste technieken voor statistische analyse, statistieken gebaseerd op replicaten of vissen, verwerking van de gegevens en beweegredenen voor het gebruik van deze technieken;
- tabelgegevens over het afzonderlijke gewicht en het gemiddelde gewicht van de vissen op dag 0, 14 (indien gemeten) en 28, waarden met betrekking tot de gemiddelde of pseudo-specifieke groeisnelheid (afhankelijk van wat van toepassing is) per bak voor de periode van dag 0-28 of eventueel dag 0-14 en 14-28;
- resultaten van de statistische analyse (d.w.z. regressieanalyse of ANOVA), bij voorkeur in grafische en tabelvorm weergegeven en de LOEC ( $p = 0,05$ ) en NOEC of EC<sub>x</sub> met, indien mogelijk, de bijbehorende standaardafwijkingen;
- gevallen van abnormale reacties bij de vissen en zichtbare effecten die werden veroorzaakt door de teststof.



### 3. REFERENTIES

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

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

(3) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) : results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(8) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method : toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.

(11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(15) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(16) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* : effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(19) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity : the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

## AANHANGSEL 1

## AANBEVOLEN VISSOORTEN VOOR DE TEST EN GESCHIKTE TESTOMSTANDIGHEDEN

Vissoort	Aanbevolen bereik van de testtemperatuur ( °C)	Fotoperiode (uren)	Aanbevolen bereik voor begingewicht van de vissen (g)	Aanbevolen meetnauwkeurigheid	Densiteit (g/l)	Bezettingsgraad per liter	Voedsel	Testduur (dagen)
<b>Aanbevolen vissoorten :</b>								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenboogforel	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	tot op 100 mg	1,2 – 2,0	4	Droog merkvoer van zalmachtig broedsel	≥ 28
<b>Andere goed gedocumenteerde vissoorten :</b>								
<i>Danio rerio</i> Zebravis	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	tot op 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	Levend voedsel (Brachionus Artemia)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> rijstvis (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	tot op 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	Levend voedsel (Brachionus Artemia)	≥ 28

## AANHANGSEL 2

## ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

STOF	CONCENTRATIES
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchloroorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

## AANHANGSEL 3

## LOGARITMISCHE REEKS CONCENTRATIES DIE GESCHIKT ZIJN VOOR DE TOXICITEITSTEST (9)

Kolom (aantal concentraties tussen 100 en 10 of tussen 10 en 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

\* Uit de kolom kan een reeks van vijf (of meer) opeenvolgende concentraties worden gekozen. De klassemiddelenwaarden tussen de concentraties in kolom (x) worden verkregen uit kolom (2x + 1). De waarden in de tabel staan voor concentraties uitgedrukt in percentage per volume of in gewicht (mg/l of µg/l). De waarden kunnen waar nodig worden vermenigvuldigd met of gedeeld door elke tiende macht. Kolom 1 kan worden gebruikt als er veel onduidelijkheid bestaat over het toxiciteitsniveau.

## C.15. VIS, KORTETERMIJN-TOXICITEITSTEST OP EMBRYONALE EN LARVESTADIA (SAC-FRY)

## 1. METHODE

Deze kortetermijn-toxiciteitstest is overgenomen van OESO TG 212 (1998).

## 1.1 Inleiding

Deze kortetermijn-toxiciteitstest op de embryonale en larvestadia van de vis is een kortetermijntest waaraan de levensstadia vanaf het pasbevruchte ei tot en met de larvetijd worden blootgesteld. Tijdens de test wordt er geen voedsel toegediend. De test moet daarom worden beëindigd terwijl de larve zich nog voedt aan de dooierzak.

Het doel van de test is het bepalen van letale en, tot op zekere hoogte, subletale effecten van chemicaliën op de specifieke stadia van de geteste diersoort. De test kan nuttige informatie bieden omdat deze (a) een brug kan vormen tussen letale en subletale tests, (b) kan dienen als screeningtest voor een volledige test over de eerste levensfase of voor een chronische-toxiciteitstest en (c) kan worden gebruikt voor het testen van vissoorten waarbij de normale technieken die worden gebruikt niet voldoende geavanceerd zijn voor het testen van de overgangperiode van endogene tot exogene voeding.

Het is belangrijk om te weten dat alleen tests die alle stadia van de levenscyclus van een vis omvatten een betrouwbare schatting kunnen geven van de chronische toxiciteit van chemicaliën bij vissen. Tevens moet men zich realiseren dat een test die niet alle stadia omvat minder gevoelig is en dat daarmee ook de chronische toxiciteit kan worden onderschat. Daarom wordt verwacht dat de embryo- en larvetest minder gevoelig is dan een volledige test over de eerste levensfase, met name ten opzichte van zeer lipofiele chemicaliën (log Pow > 4) en chemicaliën met een bepaalde toxische werking. Kleinere verschillen in de gevoeligheid tussen de twee tests zijn echter te verwachten bij chemicaliën met een niet-specifieke, narcotische werking (1).

Vóór de publicatie van deze test is de meeste ervaring met deze embryo- en larvetest opgedaan met de zoetwatervis *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae - algemene naam : zebra-*vis*). Meer gedetailleerde informatie over het uitvoeren van tests met deze vissoort is te vinden in aanhangsel 1. Het gebruik van andere vissoorten waarmee ook ervaring is opgedaan, is echter ook toegestaan (tabel 1A et 1B).

## 1.2 DEFINITIES

**Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)** : de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant effect ( $p < 0,05$ ) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter is dan de LOEC.

**No Observed Effect Concentration (NOEC)** : de testconcentratie direct onder de LOEC.

## 1.3 PRINCIPE VAN DE TEST

De embryonale en larvestadia van de vis worden blootgesteld aan een reeks concentraties van de in water opgeloste teststof. Binnen het protocol kan men kiezen tussen een semi-statische procedure en een doorstroomprocedure. De keuze hangt af van het type teststof. De test begint met het plaatsen van de bevruchte eitjes in de testkamers en eindigt vlak voordat de dooierzak van welke larve dan ook in een van de testkamers volledig is verbruikt of voordat er sterfte optreedt door verhongering in de controlegroep. Vervolgens worden de letale of subletale effecten vastgesteld en vergeleken met de controlewaarden zodat de LOEC en NOEC kunnen worden vastgesteld. De effecten kunnen ook worden geanalyseerd met een regressiemodel, zodat kan worden ingeschat wat de concentratie is die een gegeven procentueel effect kan opleveren (d.w.z.  $LC/EC_x$ , waarbij  $x$  een bepaald % effect is).

## 1.4 GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Resultaten van een acute toxiciteitstest (zie methode C. 1), bij voorkeur met dezelfde vissoort als in deze test is gebruikt, moeten beschikbaar zijn. De resultaten kunnen van pas komen bij het selecteren van de juiste reeks testconcentraties in de test die betrekking heeft op de eerste levensfase. De oplosbaarheid in water (inclusief de oplosbaarheid in testwater) en de dampspanning van de teststof moeten bekend zijn. Er moet een betrouwbare, analytische methode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

De gegevens over de teststof die nuttig zijn bij het bepalen van de testomstandigheden zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in licht, de stabiliteit onder de testcondities,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C. 4).

## 1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

Een test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan :

- het totale percentage bevruchte eitjes in de controlegroep en eventueel in de bakken met alleen het oplosmiddel dat de test overleeft, moet groter of gelijk zijn aan de minimale percentages in aanhangsel 2 en 3;
- het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test tussen 60 % en 100 % van de verzadigingswaarde van lucht liggen;
- het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers en tussen de opeenvolgende dagen mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan  $\pm 1,5$  °C. Tevens mag de watertemperatuur niet hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2 en 3).

## 1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

### 1.6.1 Testkamers

Voor de test mogen glazen bakken en bakken van ander chemisch inert materiaal worden gebruikt. De grootte van de bakken moet geschikt zijn voor de beoogde dichtheid (zie punt 1.7.1.2). Het is aan te bevelen de testkamers willekeurig in het testgebied te plaatsen. Als er systematische effecten in het laboratorium optreden die kunnen worden beheerst door het gebruik van blokken, verdient een willekeurig blokontwerp waarbij in elk blok alle behandelingen plaatsvinden de voorkeur boven een compleet willekeurig ontwerp. Als er wordt gebruikgemaakt van blokken, moet hier bij de gegevensanalyse rekening mee worden gehouden. De testkamers moeten worden beschermd tegen ongewenste invloeden van buitenaf.

### 1.6.2 Keuze van de vissoort

In tabel 1A staan de aanbevolen vissoorten. Dit sluit het gebruik van andere vissoorten niet uit (voorbeelden in tabel 1B), maar de testprocedure moet wellicht worden aangepast teneinde passende testomstandigheden te creëren. Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

### 1.6.3 Leefomstandigheden van de broedvis

Meer informatie over de relatief beste leefomstandigheden voor de broedvissen vindt u in OESO TG 210 <sup>(1)</sup> en in de referenties (2) (3) (4) (5) (6).

### 1.6.4 Omgaan met embryo's en larven

Embryo's en larven kunnen binnen de hoofdbak worden onderverdeeld in kleinere bakken die zijn voorzien van gaaswanden waardoor de testoplossing vrij door de hoofdbak kan stromen. Een niet-turbulente stroming in deze kleine bakken kan worden verkregen door deze aan een arm te hangen die ze op en neer beweegt en tegelijkertijd de organismen onder water houdt. Ook kan worden gebruikgemaakt van een sifon-spoelsysteem. Bevruchte eitjes van zalmachtigen kunnen op een rek of gaas worden gelegd met gaten die zo groot zijn dat de larven, nadat ze zijn uitgekomen, er doorheen kunnen vallen. In semi-statische tests waarbij de organismen dagelijks moeten worden overgeplaatst, kan bij het verwijderen van embryo's en larven het best gebruik worden gemaakt van pasteurpipetten (zie paragraaf 1.6.6).

Indien er eihouders, roosters of gaaswerken zijn gebruikt om de eitjes in de hoofdbak op hun plaats te houden, moeten deze worden verwijderd zodra de larven uitkomen (1). Stukken gaas die voorkomen dat vissen ontsnappen, mogen niet worden verwijderd. Als larven moeten worden overgeplaatst, mogen ze niet worden blootgesteld aan lucht en mogen er geen netten worden gebruikt om de vissen uit de eihouders te halen (deze waarschuwing is mogelijk niet van toepassing op sommige minder fragiele vissoorten, zoals de karper). Het moment van overplaatsing is afhankelijk van de vissoort. Soms is overplaatsing niet nodig. Voor de semi-statische techniek mogen bekertjes of lage bakjes worden gebruikt. Indien nodig worden de bekertjes vlak boven de bodem voorzien van een stukje gaas. Als het volume van deze bakjes voldoet aan de dichtheidvereisten (zie 1.7.1.2), is het overplaatsen van de embryo's of larven mogelijk niet nodig.

Nota's

<sup>(1)</sup> OESO, Paris; 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".



### 1.6.5 Water

Water dat voldoet aan de chemische kenmerken van geschikt verdunningswater zoals vermeld in aanhangsel 4 en waarin de gekozen vissoort minstens zo goed kan overleven als in het water dat wordt beschreven in de aanhangsels 2 en 3, is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde mag niet meer dan  $\pm 0,5$  pH-eenheden schommelen. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de broedvissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl en  $\text{SO}_4$ ), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar.

### 1.6.6 Testoplossingen

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing.

De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (ontsluitingsmiddelen) verdient geen aanbeveling; niettemin kan dit in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van passende oplosmiddelen zijn ethanol, methanol, dimethylformamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van passende dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. Als gemakkelijk biologisch afbreekbare agentia (bijvoorbeeld aceton) en/of zeer vluchtige stoffen worden gebruikt, moet worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in de doorstroomtests kunnen voordoen. Indien wordt gebruikgemaakt van een ontsluitingsmiddel, mag dit geen grote invloed hebben op de overlevingskansen en geen zichtbaar negatief effect hebben op de vroege levensstadia, hetgeen blijkt uit de controle met uitsluitend oplosmiddel. Het gebruik van deze stoffen moet echter te allen tijde zoveel mogelijk worden vermeden.

Voor de semi-statische techniek kunnen twee verschillende verversingsprocedures worden toegepast; (i) er worden nieuwe testoplossingen bereid in schone bakken en levende eitjes en larven worden in een kleine hoeveelheid oude oplossing voorzichtig naar de nieuwe schone bakken overgeplaatst waarbij blootstelling aan lucht moet worden vermeden, of (ii) de organismen blijven in de bakken terwijl een deel van het testwater (minimaal driekwart) wordt ververst. De verversingsfrequentie hangt af van de stabiliteit van de teststof, maar dagelijks verversen van water wordt aanbevolen. Als uit eerdere stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de verversingsperiode niet stabiel blijft (d.w.z. buiten 80 - 120 % van de nominale concentratie valt of onder 80 % van de gemeten oorspronkelijke concentratie), moet worden overwogen om over te gaan op een doorstroomtest. In elk geval moet erop worden toegezien dat de larven tijdens de verversingsprocedure geen stress ondervinden.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Een stroomsnelheid die overeenkomt met ten minste vijf testkamervolumes per 24 uur is wenselijk (2).

## 1.7 PROCEDURE

Voor informatie over de resultaten van de toxiciteitstest met visembryo's en -larven kunt u de bestaande literatuur raadplegen. De literatuurlijst van deze tekst bevat enkele voorbeelden (7) (8) (9).

### 1.7.1 Blootstellingsomstandigheden

#### 1.7.1.1 Duur

De test moet bij voorkeur worden gestart binnen 30 minuten na de bevruchting van de eitjes. De embryo's worden in de testoplossing geplaatst vóór, of zo snel mogelijk na, het begin van het blastodiscus-stadium en altijd vóór het begin van het gastrulastadium. Als de eitjes afkomstig zijn van een commerciële leverancier, is het niet altijd mogelijk de test direct na de bevruchting te starten. Omdat de gevoeligheid van de test sterk kan worden beïnvloed door het uitstellen van de start, moet de test binnen 8 uur na de bevruchting worden gestart. Omdat de larven gedurende de periode van blootstelling niet worden gevoederd, moet de test worden beëindigd voordat een van de larven, ongeacht in welke testkamer, de dooierzak volledig heeft verbruikt of voordat er sterfte door verhongering optreedt binnen de controlegroep. De duur hangt af van de vissoort die wordt gebruikt. In aanhangsel 2 en 3 wordt voor een aantal vissoorten de aanbevolen testduur biologisch vermeld.

#### 1.7.1.2 Densiteit

Het aantal bevruchte eitjes aan het begin van de test moet toereikend zijn om te kunnen voldoen aan de statistische vereisten. De eitjes moeten willekeurig worden verdeeld over de verschillende behandelingen. Daarbij moeten minimaal 30 bevruchte eitjes, gelijk of zo gelijk mogelijk (bij bepaalde vissoorten is het namelijk moeilijk om een gelijk aantal per groep te verkrijgen) over ten minste drie replicaat-testkamers verdeeld, per concentratie worden gebruikt. De densiteit (biomassa per volume testoplossing) moet zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal 60 % van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden. Bij doorstroomtests wordt een densiteit van maximaal 0,5 g/l per 24 uur en maximaal 5 g/l oplossing op een willekeurig moment (2) aanbevolen.

#### 1.7.1.3 Licht en temperatuur

De fotoperiode en testwatertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (aanhangsel 2 en 3). Gebruik voor het controleren van de temperatuur desgewenst een extra testbak.

### 1.7.2 Testconcentraties

Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig die een constante factor van maximaal 3,2 van elkaar verschillen. Bij het selecteren van de reeks concentraties moet rekening worden gehouden met de curve van  $\text{LC}_{50}$  tegen blootstellingsperiode tijdens het acute toxiciteitsonderzoek. In bepaalde situaties mogen minder dan vijf concentraties worden gebruikt, bijvoorbeeld bij een limiettest, en kan het interval tussen de concentraties worden verkort. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet hiervoor een geldige reden worden gegeven. Er mogen geen concentraties van de stof worden gebruikt die hoger zijn dan de  $\text{LC}_{50}$  over 96 uur of, indien dit lager is, 100 mg/l. Tevens mogen stoffen niet boven hun oplosbaarheids grens in het testwater worden getest.

Als een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt bij het maken van testoplossingen (zie punt 1.6.6), mag de uiteindelijke concentratie hiervan in de testbakken niet groter zijn dan 0,1 ml/l en moet de concentratie in alle bakken gelijk zijn.

### 1.7.3 Controles

Naast de testreeks moet er een controlegroep worden behandeld met alleen het verdunningswater (eventueel met replicaat) en, indien van toepassing, een controlegroep met water waaraan het ontsluitingsmiddel is toegevoegd (eventueel met replicaat).

### 1.7.4 Frequentie van de analytische bepalingen en metingen

Tijdens de test worden de concentraties van de teststoffen regelmatig gemeten.

In semi-statische tests waarbij wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen  $\pm 20\%$  van de nominale concentratie blijft (d.w.z. binnen het interval van 80 - 120 %; zie punt 1.4 en 1.6.6), is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen, en ten minste drie keer, verspreid over de test (d.w.z. dat monsters van dezelfde oplossing moeten worden geanalyseerd - vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen).

Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen  $\pm 20\%$  van de nominale concentratie blijft (op basis van stabiliteitsgegevens van de stof), moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd. Doe dit vlak na het bereiden en vlak vóór het verversen en volgens dezelfde procedure als hierboven (d.w.z. ten minste drie keer, verspreid over de test). Deze bepaling van de concentratie van de teststof vóór het verversen van de oplossing hoeft voor elke testconcentratie slechts bij de oplossing van één replicaat-bak te gebeuren. Het interval tussen deze metingen mag niet meer dan zeven dagen bedragen. Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Als echter kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test binnen  $\pm 20\%$  van de nominale of de gemeten oorspronkelijke concentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op de nominale of gemeten oorspronkelijke waarden.

Bij doorstroomtests is een soortgelijke procedure als hierboven van toepassing (maar de meting van « oude » oplossingen is niet van toepassing). Als de testduur echter langer is dan zeven dagen, is het mogelijk verstandig het aantal monsternemingen tijdens de eerste week te verhogen (bijvoorbeeld drie meetreeksen), zodat men zeker weet dat de testconcentraties stabiel blijven.

Monsters moeten mogelijk worden gecentrifugeerd of gefilterd (bijvoorbeeld met een 0,45  $\mu\text{m}$  poriëngrootte). Omdat echter kennelijk noch centrifugatie noch filtratie een volledige scheiding van de biologisch beschikbare en de biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof garandeert, kunnen deze behandelingen wellicht niet altijd op de monsters worden toegepast.

In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de pH en de temperatuur in alle testbakken worden gemeten. De totale hardheid en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. Het zuurstofgehalte en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten tijdens de test ten minste drie keer worden gemeten (aan het begin, omstreeks het midden en aan het eind). Bij semi-statische tests is het raadzaam het opgeloste zuurstofgehalte vaker te meten, bij voorkeur voor en na elke waterverversing of minimaal één keer per week. De pH moet bij semi-statische tests voor en na elke waterverversing worden gemeten en bij doorstroomtests minimaal één keer per week. De hardheid moet gedurende de test eenmaal worden gemeten. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten en bij voorkeur in één testbak continu worden gecontroleerd.

### 1.7.5 Waarnemingen

#### 1.7.5.1 Stadium van embryonale ontwikkeling

Het embryonale stadium (d.w.z. het gastrulastadium) bij het begin van de blootstelling aan de teststof moet zo nauwkeurig mogelijk worden vastgesteld. Hiervoor kan een representatief monster van eitjes worden gebruikt die afdoende zijn gefixeerd en geklaard. Voor een beschrijving en afbeeldingen van de embryonale stadia kan ook de literatuur worden geraadpleegd (2) (5) (10) (11).

#### 1.7.5.2 Uitkomen en overleven

Minimaal één keer per dag moet uitkomen en overleven worden geobserveerd en de aantallen geregistreerd. Het is mogelijk wenselijk om aan het begin van de test vaker te kijken (bijvoorbeeld elke 30 minuten gedurende de eerste drie uur), omdat in sommige gevallen de overlevingstijden relevanter zijn dan het aantal dode diertjes (bijvoorbeeld als er sprake is van acute toxische effecten). Dode embryo's en larven moeten direct nadat ze worden opgemerkt, worden verwijderd, omdat ze snel kunnen ontbinden. Het verwijderen van dode organismen moet zeer voorzichtig gebeuren om aanstoten en beschadigen van naastgelegen eitjes/larven te voorkomen. Deze zijn namelijk uitermate fragiel en gevoelig. De criteria voor « dood » variëren per stadium :

— **eitjes** : met name in de eerste stadia duidelijk minder doorzichtig en een verandering van kleur als gevolg van coagulatie en/of precipitatie van proteïne, hetgeen resulteert in een wit ondoorschijnend uiterlijk;

— **embryo's** : geen embryonale beweging en/of geen hartslag en/of ontkleuring en afname van doorzichtigheid bij soorten die als embryo gewoonlijk doorzichtig zijn;

— **larven** : onbeweeglijkheid en/of geen ademhaling en/of geen hartslag en/of witte ondoorschijnende kleur van het centrale zenuwstelsel en/of geen reactie op een mechanische prikkel.

#### 1.7.5.3 Afwijkend uiterlijk

Het aantal larven met een afwijkende lichaamsvorm en/of pigmentatie en de fase van het verbruik van de dooierzak moeten regelmatig, afhankelijk van de duur van de test en de aard van de afwijking, worden gerapporteerd. Embryo's en larven met een afwijking kunnen van nature voorkomen en bij sommige vissoorten kan het aantal oplopen tot enkele procenten van de controlegroep(en). Dieren met een afwijking mogen alleen uit de testbakken worden verwijderd als ze dood zijn.

#### 1.7.5.4 Afwijkend gedrag

Afwijkingen, zoals hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen en atypische onbeweeglijkheid, moeten regelmatig, afhankelijk van de duur van de test, worden gerapporteerd. Hoewel het moeilijk is deze effecten te kwantificeren, kunnen ze (indien waargenomen) helpen bij de interpretatie van de sterftcijfers doordat ze informatie geven over de toxische werking van de teststof.

#### 1.7.5.5 Lengte

Het is wenselijk om aan het eind van de test de lengte van elk organisme te meten. Hierbij kunnen de standaardlengte, de vorklengte en de totale lengte worden gemeten. Als er echter vinrot in de staart of vinerosie is opgetreden, moet de standaardlengte worden gemeten. Over het algemeen moet de variatiecoëfficiënt voor de lengte van replicaat-organismen in de controlegroepen van een goed uitgevoerde test  $\leq 20\%$  zijn.

### 1.7.5.6 Gewicht

Aan het eind van de test kan van elk organisme het gewicht worden gemeten; het droge gewicht (24 uur bij 60 °C) heeft de voorkeur boven het natte gewicht (drooggedept). Over het algemeen moet de variatiecoëfficiënt voor het gewicht van replicaat-organismen in de controlegroepen van een goed uitgevoerde test  $\leq 20\%$  zijn.

Deze waarnemingen resulteren in de volgende gegevens die alle voor een deel kunnen worden gebruikt voor een statistische analyse :

- cumulatieve sterfte;
- aantal gezonde larven aan het eind van de test;
- tijd van begin uitkomen eitjes tot eind uitkomen eitjes (d.w.z. 90 % van de eitjes in elke replicaatbak);
- aantal larven dat per dag uitkomt;
- lengte (en gewicht) van overlevende organismen aan eind van de test;
- aantal larven dat misvormd is of een afwijking vertoont;
- aantal larven dat afwijkend gedrag vertoont.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het is wenselijk om bij de opzet en analyse van de test een statisticus te betrekken omdat de methode een aanzienlijke variatie in de opzet van het experiment toelaat, bijvoorbeeld in het aantal testkamers, het aantal testconcentraties, het oorspronkelijk aantal bevruchte eitjes en de gemeten parameters. Gezien de beschikbare opties in de opzet van de test, worden hier geen richtlijnen voor de statistische procedures gegeven.

Als de LOEC/NOEC wordt bepaald, moet de variatie binnen elke set replicaatbakken worden geanalyseerd met behulp van ANOVA (variantie-analyse) of kruistabellen. Bij het maken van een meervoudige vergelijking tussen de resultaten van de afzonderlijke concentraties en de resultaten van de controlegroepen, komt de methode van Dunnett mogelijk goed van pas (12) (13). Er zijn ook andere bruikbare methoden beschikbaar (14) (15). De omvang van het effect dat met ANOVA of een andere methode kan worden vastgesteld, (d.w.z. het onderscheidingsvermogen van de test) moet worden berekend en gerapporteerd. Overigens zijn niet alle waarnemingen die worden vermeld in punt 1.7.5.6 geschikt voor statistische analyse met ANOVA. De cumulatieve sterfte en het aantal gezonde larven aan het eind van de test kunnen bijvoorbeeld worden geanalyseerd met probitmethoden.

Als de LC/EC<sub>x</sub> wordt bepaald, moet er een geschikte curve (of meerdere curven), zoals de logistische curve, worden bepaald voor de gegevens met behulp van een statistische methode, zoals de kleinste kwadraten-methode of de niet-lineaire kleinste kwadratenmethode. De curven moeten worden geparаметriséerd zodat LC/EC<sub>x</sub> en de standaardafwijking direct kunnen worden bepaald. Hierdoor wordt het berekenen van de betrouwbaarheidsgrenzen van de LC/EC<sub>x</sub> een stuk eenvoudiger. Tenzij er goede redenen zijn om andere betrouwbaarheidsniveaus te hanteren, moet een betrouwbaarheid van 95 % aan beide zijden worden aangehouden. De passingsprocedure moet bij voorkeur een middel bieden waarmee de significantie van de mate waarin de curve niet past, kan worden berekend. Voor het maken van de curven kunnen grafische methoden worden gebruikt. Regressieanalyse is geschikt voor alle waarnemingen in punt 1.7.5.6.

### 2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten toxische concentraties in de testoplossingen in de buurt liggen van de detectie van de analysemethode. De resultaten voor concentraties die de oplosbaarheidsgrens van de teststof in water overschrijden, moeten ook voorzichtig worden geïnterpreteerd.

### 2.3 TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

#### 2.3.1 Teststof :

- fysiek voorkomen en relevante fysisch-chemische kenmerken;
- chemische identificatiegegevens, voorzover relevant met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de hoeveelheid van de teststof.

#### 2.3.2 Diersoort :

- wetenschappelijke naam, stam, aantal moedervissen (d.w.z. het aantal vrouwtjes dat werd gebruikt voor het produceren van het benodigde aantal eitjes in de test), herkomst en de methode waarop de bevruchte eitjes werden verzameld en vervolgens werden behandeld.

#### 2.3.3 Testomstandigheden

- toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statische test of doorstroomtest, tijdsduur vanaf bevruchting tot start van de test, dichtheid, enz.);
- fotoperiode(n);
- testopzet (bijvoorbeeld het aantal testkamers en replicaten, het aantal embryo's per replicaat);
- wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moeten de aard en de concentratie daarvan worden vermeld);
- de nominale testconcentraties, de in de testbakken gemeten waarden met gemiddelden en standaardafwijkingen en de methode waarmee zij zijn bepaald, en, indien de teststof bij een lagere concentratie dan in de testsituatie oplosbaar is in water, moet worden aangetoond dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de stof in de testoplossing;
- kenmerken van het verdunningswater: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC), zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;
- waterkwaliteit in de testbakken : pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof.

#### 2.3.4 Resultaten :

- resultaten van eventuele voorbereidende onderzoeken naar de stabiliteit van de teststof;
- gegevens waaruit blijkt dat de totale overleving in de controlegroepen voldeed aan de aanvaardbaarheidsnorm voor het gebruikte proefdier (aanhangsel 2 en 3);
- gegevens over de sterfte/overleving tijdens de embryonale en larvestadia en de totale sterfte/overleving;
- aantal dagen waarbinnen de eitjes zijn uitgekomen en aantal uitgekomen eitjes;
- gegevens over lengte (en gewicht);
- gevallen en beschrijving van morfologische afwijkingen (indien aanwezig);
- gevallen en beschrijving van effecten op het gedrag (indien aanwezig);
- statistische analyse en verwerking van de gegevens;

— bij tests die zijn geanalyseerd met ANOVA, de LOEC bij  $p = 0,05$  en de NOEC voor elke reactie die is vastgesteld, met inbegrip van een beschrijving van de statistische procedures die zijn gebruikt en een indicatie van de omvang van het waar te nemen effect;

— bij tests die zijn geanalyseerd met regressietechnieken, de  $LC/EC_x$  en betrouwbaarheidsintervallen, en een grafiek van het aangepaste model dat werd gebruikt voor de berekening;

— beweegredenen voor eventuele afwijkingen van deze testmethode.

### 3. REFERENTIES

(1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp., June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88, 26 pp.

(3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish : Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish : Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10., pp. 121-173

(6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp.328-330

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71

(8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821

(9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145

(10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4) : 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina, 36 pp.

(12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121

(13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

(15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp.321-334

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp.126-134

(18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252 : pp. 231-236

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test : an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10 : Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes : New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In : W.S. Hoar and D.J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp.1-58

TABEL 1A : AANBEVOLEN VISSOORTEN VOOR DE TEST

#### ZOETWATERVISSSEN

*Oncorhynchus mykiss*  
Regenboogforel (9) (16)

*Danio rerio*  
Zebravis (7) (17) (18)

*Cyprinus caprio*  
Karper (8) (19)

*Oryzias latipes*  
Japanse rijstvis/Medaka (20) (21)

*Pimephales promelas*  
« Fathead minnow » (8) (22)



TABEL 1B : VOORBEELDEN VAN ANDERE  
GOED-GEDOCUMENTEERDE VISSOORTEN DIE AL EENS ZIJN GEBRUIKT

ZOETWATERVISSEN	ZOUTWATERVISSEN
<i>Carassius auratus</i> Goudvis (8)	<i>Menidia peninsulae</i> « Tidewater silverside » (23) (24) (25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Zonnebaars (8)	<i>Clupea harengus</i> Haring (24) (25)
	<i>Gadus morhua</i> Kabeljauw (24) (25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Edelsteen tandkarper (23) (24) (25)

#### AANHANGSEL 1

### RICHTLIJNEN BIJ HET UITVOEREN VAN EEN TOXICITEITSTEST MET EMBRYO'S EN LARVEN (SAC-FRY) VAN DE ZEBRAVIS (BRACHYDANIO RERIO)

#### INLEIDING

De zebravis komt oorspronkelijk voor in de snelstromende rivieren in het gebied van de kust van Coromandel in India. De vis wordt vaak gebruikt in aquaria en behoort tot de karperachtigen. Voor informatie over het kweken en verzorgen van zebra-vissen kunnen de standaard-naslagwerken over tropische vissen worden geraadpleegd. De biologie van de vis en zijn gebruik in visgerijonderzoek is bestudeerd door Laale (1).

De vis wordt zelden langer dan 45 mm. De romp is cilindrisch en heeft 7-9 donkerblauwe, horizontale, zilverachtige strepen. Deze strepen lopen tot aan de anale en staartvinnen. De rug is olijfgroen. De mannetjes zijn dunner dan de vrouwtjes. De vrouwtjes zijn zilveriger en hebben een opgezwollen buik, met name vlak voor het kuitschieten.

De volwassen vissen zijn bestand tegen grote schommelingen in de temperatuur, pH en hardheid. Om de vissen echter gezond te houden, zodat de eitjes die worden geproduceerd van goede kwaliteit zijn, moeten optimale omstandigheden worden gecreëerd.

Bij het kuitschieten wordt het vrouwtje door het mannetje achtervolgd en aangestoten. Zodra de eitjes worden uitgestoten, worden ze bevrucht. De eitjes, die doorzichtig en niet-klevend zijn, vallen op de bodem, waar ze soms door de ouders worden opgegeten. Het kuitschieten wordt beïnvloed door licht. Als er 's ochtends voldoende licht is, vindt het kuitschieten gewoonlijk in de eerste uren na zonsopgang plaats.

Een vrouwtje kan met tussenpozen van een week wel honderden eitjes per keer produceren.

#### LEEFOMSTANTIGHEDEN VAN DE OUDERVISSEN, REPRODUCTIE EN VROEGE LEVENSTADIA

Selecteer een geschikt aantal gezonde vissen en plaats deze ten minste twee weken voor het geplande kuitschieten in het juiste water (zie aanhangsel 4). De vissen moeten zich minimaal eenmaal hebben voortgeplant voordat ze de eitjes produceren die voor de test worden gebruikt. De dichtheid van de vissen mag in deze periode niet groter zijn dan 1 gram vis per liter. Als het water regelmatig wordt verversd of er wordt gebruikgemaakt van zuiveringssystemen, is het mogelijk de dichtheid te verhogen. In de bakken moet een temperatuur van  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  worden gehandhaafd. De vissen moeten gevarieerd voedsel krijgen, bijvoorbeeld geschikt commercieel verkrijgbaar droogvoer, pas uitgekomen artemia, chironomiden, daphnia en enchytreeën.

Hieronder worden twee procedures beschreven. In het verleden hebben deze geleid tot een groep gezonde bevruchte eitjes, die groot genoeg was om er een test mee uit te voeren.

i. Acht vrouwtjes en zestien mannetjes worden in een aquarium met 50 liter verdunningswater geplaatst. Ze worden afgeschermd van direct licht en minimaal 48 uur zo min mogelijk gestoord. Op de middag vóór de dag dat de test van start gaat, wordt onderin het aquarium een kuitbak geplaatst. Deze bestaat uit een frame (plexiglas of ander geschikt materiaal) van 5-7 cm hoog met een grof net van 2-5 mm bovenin en een fijn net van 10-30  $\mu\text{m}$  onderin. Aan het grove net van het frame wordt een aantal « kuitbomen » bevestigd. Deze zijn gemaakt van uit nylon touw dat is losgedraaid. Nadat de vissen 12 uur in het donker hebben doorgebracht, wordt er een zwak licht aangedaan waarna het kuitschieten op gang komt. Twee tot vier uur na het kuitschieten, wordt de kuitbak verwijderd en worden de eitjes verzameld. De kuitbak zorgt ervoor dat de vissen de eitjes niet kunnen opeten en dat de eitjes gemakkelijk kunnen worden verzameld. De groep vissen moet zich al minimaal eenmaal hebben voortgeplant voordat de eitjes worden geproduceerd die voor de test worden gebruikt.

ii. Vijf tot tien vrouwtjes- en mannetjesvissen worden minimaal twee weken voor het geplande kuitschieten in aparte bakken ondergebracht. Na 5-10 dagen zijn de buikjes van de vrouwtjes opgezwollen en zijn hun genitale papillen zichtbaar. Bij mannetjesvissen ontbreken deze. Het kuitschieten vindt plaats in een speciaal aquarium dat onderin is voorzien van een gaaswerk (zie boven). Het aquarium wordt tot 5-10 cm boven dit gaaswerk gevuld met verdunningswater. Op de dag voordat het kuitschieten moet plaatsvinden, worden er één vrouwtje en twee mannetjes in geplaatst. De watertemperatuur wordt geleidelijk verhoogd totdat het water één graad warmer is dan de acclimatiseringstemperatuur. Het licht wordt gedoofd en het aquarium moet vervolgens zoveel mogelijk met rust worden gelaten. 's Ochtends wordt er een zwak licht aangedaan waarna het kuitschieten op gang komt. Na 2-4 uur worden de vissen verwijderd en de eitjes verzameld. Als er meer eitjes nodig zijn dan het aantal dat één vrouwtje kan produceren, kunnen er meerdere aquaria tegelijk worden gebruikt. Als vóór de test wordt vastgelegd wat de voortplantingsresultaten van de afzonderlijk vrouwtjes zijn (aantal eitjes en kwaliteit), kunnen de vrouwtjes die het hoogst scoren, worden gebruikt voor het kuitschieten.

De eitjes moeten in glazen zuigbuisjes (inwendige diameter minimaal 4 mm) met een flexibele ballon worden overgeplaatst naar de testbakken. De hoeveelheid water waarin de eitjes worden vervoerd moet zo klein mogelijk zijn. De eitjes zijn zwaarder dan water en zakken uit het buisje. Zorg ervoor dat de eitjes (en larven) niet in contact komen met lucht. Om er zeker van te zijn dat er zich in de eerste ontwikkelingsstadia geen onregelmatigheden voordoen, moet er een microscopisch onderzoek worden verricht op een monster (of meerdere monsters) van de eitjes. De eitjes mogen niet worden gedesinfecteerd.

Het sterftecijfer onder de eitjes is het hoogst binnen 24 uur na de bevruchting. In deze periode is een sterfte van 5-40 % niet uitzonderlijk. Eitjes sterven af door een mislukte bevruchting of door stoornissen in de ontwikkeling. De kwaliteit van de eitjes lijkt afhankelijk te zijn van de vrouwtjesvis die ze heeft geproduceerd. Sommige vrouwtjes produceren namelijk altijd eitjes van een goede kwaliteit en andere nooit. Ook het ontwikkelingstempo en de snelheid waarmee de eitjes uitkomen, verschillen per groep eitjes. De eitjes die met succes zijn bevrucht en de larven hebben hoge overlevingskansen, gewoonlijk 90 % of hoger. Bij 25 °C komen de eitjes 3-5 dagen na de bevruchting uit. De dooierzak is ongeveer 13 dagen na de bevruchting volledig verbruikt.

De ontwikkeling van het embryo is goed beschreven door Hisaoka en Battle (2). Doordat de eitjes en de uitgekomen larven doorzichtig zijn, kan de ontwikkeling van de vis worden gevolgd en kunnen misvormingen worden waargenomen. Ongeveer 4 uur na kuitschieten, kunnen de niet-bevruchte eitjes worden onderscheiden van de bevruchte eitjes (3). Om dit te kunnen zien, worden de eitjes en larven in een kleine testbak geplaatst en bestudeerd onder een microscoop.

De testomstandigheden voor de vroege levensstadia worden genoemd in aanhangsel 2. De optimale waarden voor de pH en de hardheid van het verdunningswater zijn respectievelijk 7,8 en 250 mg CaCO<sub>3</sub>/l.

#### BEREKINGEN EN STATISTIEKEN

Hiervoor wordt een tweefasige aanpak aanbevolen. Eerst worden de gegevens over sterfte, abnormale ontwikkeling en de duur van het uitkomen van de eitjes statistisch geanalyseerd. Vervolgens wordt in concentraties waarbij geen negatieve effecten op een van deze parameters werd geconstateerd, de lengte van de visjes statistisch bepaald. Deze aanpak wordt aanbevolen omdat de stof selectief kleinere visjes kan doden, de duur van het uitkomen kan vertragen en zware misvormingen kan veroorzaken, waardoor de lengtemetingen een vertekend beeld kunnen geven. Bovendien wordt er per behandeling ongeveer hetzelfde aantal vissen gemeten en kan zodoende de betrouwbaarheid van de teststatistieken worden gegarandeerd.

#### BEPALEN VAN LC<sub>50</sub> EN EC<sub>50</sub>

Het percentage overlevende eitjes en larven wordt berekend en gecorrigeerd voor de sterfte in de controlegroepen volgens de formule van Abbott (4) :

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

Waarbij

P = gecorrigeerd % overleving

P' = % overleving waargenomen bij testconcentratie

C = % overleving in controlegroep

Indien mogelijk wordt aan het eind van de test met een passende methode de LC<sub>50</sub> bepaald.

Als het wenselijk is ook de morfologische afwijkingen in de statistische EC<sub>50</sub> op te nemen, kan hiervoor Stephan (5) worden geraadpleegd.

#### VASTSTELLEN VAN DE LOEC EN NOEC

Eén doel van een embryo- en larvetest is de testgroepen te vergelijken met de controlegroep, d.w.z. het bepalen van de LOEC. Hiertoe moeten verschillende vergelijkingsprocedures worden toegepast (6) (7) (8) (9) (10).

#### REFERENTIES

(1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. *J. Fish Biol.* 10, pp.121-173.

(2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) *J. Morph.*, 102, pp. 311.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). *Journal of Applied Ichthyology*, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D.J. (1971). *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.

(5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Fifth Conference*, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics* 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

## AANHANGSEL 2

## TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR AND OVERLEVINGSCRITERIA VOOR AANBEVOLEN VISSOORTEN

VISSOORT	TEMP (0C)	ZOUTGEHALTE (0/00)	FOTOPERIODE (in uren)	DUUR VAN DE STADIA (in dagen)		NORMALE DUUR VAN TEST	OVERLEVING BINNEN CONTROLEGROEP (MINIMUM %)	
				Embryo	Larve		Uitkomen eitjes	Na uitkomen eitjes
ZOETWATER								
<i>Brachydanio rerio</i> Zebravis	25 ± 1	-	12 - 16	3 - 5	8 - 10	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-10 dagen)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenboogforel	10 ± 1(1) 12 ± 1(2)	-	0 (3)	30 - 35	25 - 30	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 20 dagen na het uitkomen van de eitjes (50-55 dagen)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Karper	21 - 25	-	12 - 16	5	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-9 dagen)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Japanse rijstvis/ Medaka	24 ± 1(1) 23 ± 1(2)	-	12 - 16	8 - 11	4 - 8	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (13-16 dagen)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> "Fathead minnow"	25 ± 2	-	16	4 - 5	5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-9 dagen)	60	70

(1) Voor embryo's

(2) Voor larven

(3) Duisternis voor embryo's en larven tot een week nadat de eitjes zijn uitgekomen, behalve wanneer ze worden geïnspecteerd. Daarna zwak licht tot het eind van de test.

## AANHANGSEL 3

## TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR AND OVERLEVINGSCRITERIA VOOR ANDERE GOED GEDOCUMENTEERDE VISSOORTEN

VISSOORT	TEMPERATUUR (°C)	ZOUTGEHALTE (0/00)	FOTOPERIODE (in uren)	DUUR VAN DE STADIA (in dagen)		NORMALE DUUR VAN EMBRYO EN LARVETEST	OVERLEVING BINNEN CONTROLEGROEP (MINIMUM %)	
				Embryo	Larve		Uitkomen eitjes	Na uitkomen eitjes
ZOETWATER								
<i>Carassius auratus</i> Goudvis	24 ± 1	-	-	3 - 4	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (7 dagen)	-	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Zonnebaars	21 ± 1	-	16	3	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (7 dagen)	-	75
ZOUTWATER								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	22 - 25	15 - 22	12	1.5	10	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (6-7 dagen)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Haring	10 ± 1	8 - 15	12	20 - 25	3 - 5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 3 dagen na het uitkomen van de eitjes (23-27 dagen)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Kabeljauw	5 ± 1	5 - 30	12	14 - 16	3 - 5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 3 dagen na het uitkomen van de eitjes (18 dagen)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Edelsteentandkarper	25 ± 1	15 - 30	12	-	-	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4/7 dagen na het uitkomen van de eitjes (28 dagen)	> 75	80

## AANHANGSEL 4

## ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

STOF	CONCENTRATIE
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchloorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

## C.16. HONINGBIJEN - ACUTE-TOXICITEITSTEST (ORAAAL)

## 1. METHODE

De methode die voor deze acute-toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 213 (1998).

## 1.1 INLEIDING

Deze toxiciteitstest is een laboratoriummethode die bedoeld is voor de bepaling van de acute orale toxiciteit van gewasbeschermingsproducten en andere chemische stoffen voor volgroeide werkbijen.

Bij de vaststelling en evaluatie van de toxische eigenschappen van stoffen kan het nodig zijn de acute orale toxiciteit in honingbijen te bepalen, bv. wanneer het waarschijnlijk is dat bijen aan een bepaalde chemische stof worden blootgesteld. Het onderzoek naar de acute orale toxiciteit wordt uitgevoerd om de inherente toxiciteit van pesticiden en andere chemische stoffen voor bijen te bepalen. De resultaten van deze test moeten gebruikt worden om te bepalen of verdere evaluatie nodig is. Deze methode kan met name worden gebruikt bij stapsgewijze programma's om de gevaren van pesticiden voor bijen te evalueren, waarbij in de loop van het onderzoek wordt overgegaan van toxiciteitstests in laboratoria naar semiveld- en veldexperimenten (1). Pesticiden kunnen worden getest als actieve stof (a.s.) of als kant-en-klare producten.

Er moet een toxische standaard worden gebruikt om de gevoeligheid van bijen en de nauwkeurigheid van de testprocedure te verifiëren.

## 1.2 DEFINITIES

**Acute orale toxiciteit** : omvat de schadelijke effecten die binnen een maximale periode van 96 uur na de orale toediening van een enkelvoudige dosis van de teststof optreden.

**Dosis** : is de hoeveelheid toegediende teststof. De dosis wordt uitgedrukt in het gewicht (µg) van de teststof per proefdier (µg/bij). De werkelijke dosis voor elke bij kan niet worden berekend, omdat de bijen gezamenlijk worden gevoerd, maar een schatting van de gemiddelde dosis is wel mogelijk (totaal verbruikte teststof/aantal proefbijen in één korf).

**LD<sub>50</sub> (mediaan letale dosis) oraal** : is een statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis oraal hebben ontvangen, de dood intreedt. De LD<sub>50</sub>-waarde wordt uitgedrukt in µg teststof per bij. Bij pesticiden kan de teststof een actieve stof (a.s.) of een kant-en-klaar product zijn dat een of meer actieve stoffen bevat.

**Sterfte** : een dier wordt als dood geregistreerd als het volledig immobiel is.

## 1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Volgroeide werkbijen (*Apis mellifera*) worden blootgesteld aan een aantal doses van de teststof gedispergeerd in een sacharoseoplossing. Vervolgens wordt aan de bijen hetzelfde voer toegediend, zonder de teststof. Gedurende ten minste 48 uur wordt de sterfte dagelijks geregistreerd en vergeleken met de controlewaarden. Indien het sterftepercentage tussen 24 uur en 48 uur stijgt, terwijl de sterfte in de controlegroep op een aanvaardbaar niveau blijft, d.w.z. ≤ 10 %, is het gepast de duur van de test tot maximaal 96 uur te verlengen. De resultaten worden geanalyseerd om de LD<sub>50</sub> bij 24 uur en 48 uur te berekenen en, wanneer het onderzoek wordt verlengd, bij 72 uur en 96 uur.

## 1.4 VALIDITEIT VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig :

— aan het einde van de test mag de gemiddelde sterfte voor het totale aantal bijen in de controlegroepen niet meer dan 10 % bedragen;

— de LD<sub>50</sub> van de toxische standaard ligt binnen het gespecificeerde bereik.

## 1.5 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

## 1.5.1 Verzameling van de bijen

Voor de test worden jonge, volgroeide werkbijen van hetzelfde ras gebruikt, d.w.z. bijen met dezelfde leeftijd, voedingsstatus enz. De bijen moeten afkomstig zijn van voldoende gevoede, gezonde, zoveel mogelijk ziektevrije en van een goede koningin voorziene volken met een bekende geschiedenis en fysiologische status. Ze kunnen op de ochtend van het gebruik of de avond vóór de test worden gevangen en tot de volgende dag onder dezelfde omstandigheden als tijdens de proef worden gehouden. Bijen uit korven zonder broedsel zijn geschikt. Het is af te raden bijen vroeg in de lente of laat in de herfst te vangen, omdat ze in die periode een andere fysiologie hebben. Wanneer proeven vroeg in de lente of laat in de herfst uitgevoerd moeten worden, kunnen de bijen in een incubator worden gehouden en gedurende één week met « bijenbrood » (stuifmeel dat uit de honingraat is verzameld) en een sacharoseoplossing worden grootgebracht. Bijen die met chemische stoffen zijn behandeld, bv. met antibiotica of antivarroaproducten, mogen gedurende vier weken na beëindiging van de laatste behandeling niet voor toxiciteitstests worden gebruikt.



### 1.5.2 Huisvestings- en voedingsomstandigheden

De gebruikte korven moeten gemakkelijk te reinigen en goed geventileerd zijn. Elk geschikt materiaal kan worden gebruikt, bv. roestvrij staal, gaas, kunststof of wegwerphout. Groepen van tien bijen per korf verdienen de voorkeur. De grootte van de korven moet geschikt zijn voor het aantal bijen, d.w.z. ze moeten voldoende ruimte bieden.

De bijen moeten in een laboratoriumruimte onder donkere omstandigheden en bij een temperatuur van  $25 \pm 2$  °C worden gehouden. De relatieve vochtigheid, normaliter ca. 50-70 %, moet gedurende de test geregistreerd worden. Alle handelingen, waaronder behandeling en waarnemingen, kunnen bij (dag)licht worden verricht. Als voedsel wordt een sacharoseoplossing in water met een eindconcentratie van 500 g/l (50 % g/v) gebruikt. Na de toediening van de testdoses moet ad libitum voedsel worden verstrekt. Het voedselsysteem moet registratie van het voedselverbruik voor elke korf mogelijk maken (zie 1.6.3.1). Er kan een glazen buis (ca. 50 mm lang en 10 mm breed met aan het open uiteinde een versmalling van de diameter tot 2 mm) worden gebruikt.

### 1.5.3 Voorbereiding van de bijen

De verzamelde bijen worden willekeurig in de testkorven ingedeeld, die op hun beurt willekeurig in de laboratoriumruimte worden geplaatst.

De bijen mag maximaal 2 uur vóór aanvang van de proef voedsel worden onthouden. Het wordt aanbevolen de bijen vóór de behandeling voedsel te onthouden, zodat alle bijen qua darminhoud aan het begin van de proef aan elkaar gelijk zijn. Stervende bijen moeten voor aanvang van de proef worden vervangen door gezonde exemplaren.

### 1.5.4 Voorbereiding van de doses

Wanneer de teststof met water kan worden gemengd, kan deze direct in een 50 % sacharoseoplossing worden gedispergeerd. Bij technische producten en stoffen met een geringe oplosbaarheid in water kunnen media zoals organische oplosmiddelen, emulgators of dispergeermiddelen die een laag toxisch effect op bijen hebben (bv. aceton, dimethylformamide, dimethylsulfoxide), worden gebruikt. De concentratie van het medium is afhankelijk van de oplosbaarheid van de teststof en moet gelijk zijn voor alle onderzochte concentraties. Een mediumconcentratie van 1 % is algemeen geschikt en mag niet worden overschreden.

Er moeten geschikte controleoplossingen worden voorbereid, d.w.z. oplossingen waarbij een oplos- of dispergeermiddel wordt gebruikt om de teststof oplosbaar te maken. Er moeten twee aparte controlegroepen worden gebruikt: een oplossing in water en een sacharoseoplossing waarbij het oplosmiddel/de drager de bij de dosering van de oplossing gebruikte concentratie heeft.

## 1.6 PROCEDURE

### 1.6.1 Test- en controlegroepen

Het aantal geteste doses en replicaties moet voldoen aan de statistische vereisten voor de bepaling van de  $LD_{50}$  met de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen. Normaliter zijn voor de test vijf doses nodig in een geometrische reeks, met een factor van ten hoogste 2,2, die alle waarden voor de  $LD_{50}$  omvatten. Toch moeten de verdunningsfactor en het aantal concentraties voor dosering worden bepaald ten opzichte van de helling van de toxiciteitscurve (dosis/sterfte-curve), waarbij rekening moet worden gehouden met de statistische methode die voor de analyse van de resultaten is gekozen. Aan de hand van een verkennende proef kunnen de juiste concentraties voor de dosering worden gekozen.

Een dosis van elke testconcentratie wordt toegediend aan minimaal drie gelijke testgroepen, elk bestaande uit tien bijen. Naast de testgroep moeten ten minste drie controlegroepen, elk bestaande uit tien bijen, worden gebruikt. Ook bij de gebruikte oplosmiddelen/dragers moet gebruik worden gemaakt van controlegroepen (zie 1.5.4).

### 1.6.2 Toxische standaard

Bij de testreeks moet een toxische standaard worden toegepast. Er moeten ten minste drie doses worden gekozen om de verwachte  $LD_{50}$ -waarde te dekken. Voor elke testdosis worden ten minste drie gelijke korven met elk tien bijen gebruikt. Als toxische standaard kan het best dimethoaat worden gebruikt, waarvan de geregistreerde orale  $LD_{50}$  24 uur tussen 0,10 en 0,35 µg a.s./bij ligt (2). Andere toxische standaarden zijn echter ook aanvaardbaar, voorzover voldoende gegevens verstrekt kunnen worden om de verwachte dosisrespons te kunnen verifiëren (bv. parathion).

### 1.6.3 Blootstelling

#### 1.6.3.1 Toediening van de doses

Aan elke testgroep bijen moet een dosis van 100-200 µl van een 50 % sacharoseoplossing in water worden toegediend met de juiste concentratie van de teststof. Bij producten met een geringe oplosbaarheid, lage toxiciteit of lage concentratie in de samenstelling moeten grotere hoeveelheden worden gebruikt, omdat in de sacharoseoplossing hogere verhoudingen gebruikt moeten worden. Er moet worden bijgehouden hoeveel behandeld voedsel elke groep verbruikt. Zodra het voedsel is verbruikt (meestal binnen 3-4 uur), moet de voedselhouder uit de korf worden verwijderd en vervangen worden door een houder met uitsluitend de sacharoseoplossing. De sacharoseoplossingen worden dan ad libitum verstrekt. Voor sommige mengsels, bij hogere concentraties, kan een weigering van de testdosis ertoe leiden dat weinig of geen voedsel wordt verbruikt. Na uiterlijk 6 uur moet het niet-verbruikte behandelde voedsel worden vervangen door uitsluitend de sacharoseoplossing. De verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel wordt bepaald (bv. meting van volume/gewicht van het resterende behandelde voedsel).

#### 1.6.3.2 Duur

De proef duurt bij voorkeur 48 uur, te beginnen nadat de testoplossing is vervangen door uitsluitend de sacharoseoplossing. Indien de sterfte na de eerste 24 uur met meer dan 10 % blijft stijgen, moet de proef tot maximaal 96 uur worden verlengd, mits de sterfte in de controlegroep niet meer dan 10 % bedraagt.

### 1.6.4 Waarnemingen

De sterfte wordt 4 uur na aanvang van de test en vervolgens na 24 uur en 48 uur (d.w.z. na de toediening van de dosis) geregistreerd. Wanneer de observatieperiode moet worden verlengd, moeten om de 24 uur, tot een maximum van 96 uur, verdere bepalingen worden uitgevoerd, mits de sterfte in de controlegroep niet hoger is dan 10 %.

De verbruikte hoeveelheid voedsel per groep moet worden geschat. Een vergelijking van de verbruikte hoeveelheden behandeld en onbehandeld voedsel binnen de genoemde 6 uur kan informatie opleveren over de smakelijkheid van het behandelde voedsel.

Alle abnormale gedragseffecten die in de proefperiode worden waargenomen, moeten geregistreerd worden.

### 1.6.5 Limiettest

In sommige gevallen (bv. wanneer verwacht wordt dat een bepaalde teststof een lage toxiciteit heeft) kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 µg a.s./bij, om aan te tonen dat de LD<sub>50</sub> hoger is dan deze waarde. Dezelfde procedure moet worden toegepast, inclusief drie gelijke testgroepen, voor de testdosis, de relevante controlegroepen, de bepaling van de verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel en het gebruik van de toxische standaard. Indien sterfte optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen (zie 1.6.4), dienen deze te worden vermeld.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 GEGEVENS

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere behandelingsgroep alsmede voor de controlegroep en de groep met de toxische standaard laten zien : het aantal gebruikte bijen, de sterfte op elk observatietijdstip en het aantal bijen dat abnormaal gedrag vertoont. De sterftcijfers worden met geschikte statistische methoden geanalyseerd (bv. probitmethode, voortschrijdend gemiddelde, binomiale waarschijnlijkheid) (3) (4). Maak dosis/respons-curven op elk aanbevolen observatietijdstip en bereken de hellingen van de curven en de mediaan letale dosis (LD<sub>50</sub>) met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4) (5). Wanneer het behandelde voedsel niet volledig wordt verbruikt, moet per groep worden bepaald welke dosis van de teststof is verbruikt. De LD<sub>50</sub> wordt uitgedrukt in µg teststof per bij.

### 2.2 VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

#### 2.2.1 Teststof :

- fysieke aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen (bv. stabiliteit in water, dampspanning);
- chemische identificatiegegevens, waaronder structuurformule, zuiverheid (d.w.z. voor pesticiden de identiteit en concentratie van de actieve stof(fen)).

#### 2.2.2 Diersoort :

- wetenschappelijke naam, stam, bij benadering de leeftijd (in weken), verzamelingsmethode, gegevens over de verzameling;
- informatie over de volken die gebruikt zijn voor de verzameling van de testbijen, inclusief gezondheid, ziekten bij volgroeide bijen, voorbehandeling enz.

#### 2.2.3 Proefomstandigheden :

- temperatuur en relatieve vochtigheid van de laboratoriumruimte;
- huisvestingsomstandigheden, inclusief soort, grootte en materiaal van de korven;
- methoden voor de bereiding van de stam- en testoplossingen (wanneer gebruikt moet zowel het oplosmiddel als de concentratie daarvan worden vermeld);
- proefopzet, bv. aantal en gebruikte testconcentraties, aantal controlegroepen; voor elke testconcentratie en controlegroep het aantal gelijke korven en het aantal bijen per korf;
- datum van de proef.

#### 2.2.4 Resultaten :

- wanneer uitgevoerd de resultaten van een verkennend onderzoek;
- ruwe gegevens : sterfte bij elke geteste dosis op elk observatietijdstip;
- grafiek van de dosis/respons-curven aan het einde van de test;
- LD<sub>50</sub>-waarden met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, op elk van de aanbevolen observatietijdstippen, voor de teststof en de toxische standaard;
- statistische methoden die gebruikt zijn voor de bepaling van de LD<sub>50</sub>;
- sterfte in de controlegroepen;
- andere waargenomen of gemeten biologische effecten, bv. abnormaal gedrag van de bijen (inclusief weigering van de testdosis), hoeveelheid verbruikt voedsel in behandelde en onbehandelde groepen;
- elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

### 3. REFERENTIES

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

## C.17. HONINGBIJEN - ACUTE-TOXICITEITSTEST (CONTACT)

### 1. METHODE

De methode die voor deze acute-toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 214 (1998).

#### 1.1 INLEIDING

Deze toxiciteitstest is een laboratoriummethode die bedoeld is voor de bepaling van de acute contacttoxiciteit van gewasbeschermingsproducten en andere chemische stoffen voor volgroeide werkbijen.

Bij de vaststelling en evaluatie van de toxische eigenschappen van stoffen kan het nodig zijn de acute contacttoxiciteit in honingbijen te bepalen, bv. wanneer het waarschijnlijk is dat bijen aan een bepaalde chemische stof worden blootgesteld. Het onderzoek naar de acute contacttoxiciteit wordt uitgevoerd om de inherente toxiciteit van pesticiden en andere chemische stoffen voor bijen te bepalen. De resultaten van deze test moeten gebruikt worden om te bepalen of verdere evaluatie nodig is. Deze methode kan met name worden gebruikt bij stapsgewijze programma's om de gevaren van pesticiden voor bijen te evalueren, waarbij in de loop van het onderzoek wordt overgegaan van toxiciteitstests in laboratoria naar semiveld- en veldexperimenten (1). Pesticiden kunnen worden getest als actieve stof (a.s.) of als kant-en-klare producten.

Er moet een toxische standaard worden gebruikt om de gevoeligheid van bijen en de nauwkeurigheid van de testprocedure te verifiëren.

#### 1.2 DEFINITIES

**Acute contacttoxiciteit** : omvat de schadelijke effecten die binnen een maximale periode van 96 uur na de lokale toediening van een enkelvoudige dosis van de teststof optreden.

**Dosis** : is de hoeveelheid toegediende teststof. De dosis wordt uitgedrukt in het gewicht ( $\mu\text{g}$ ) van de teststof per proefdier ( $\mu\text{g}/\text{bij}$ ).

**LD<sub>50</sub> (mediaan letale dosis) contact** : is een statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis door contact hebben ontvangen, de dood intreedt. De LD<sub>50</sub>-waarde wordt uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  teststof per bij. Bij pesticiden kan de teststof een actieve stof (a.s.) of een kant-en-klare product zijn dat een of meer actieve stoffen bevat.

**Sterfte** : een dier wordt als dood geregistreerd als het volledig immobiel is.

#### 1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Volgroeide werkbijen (*Apis mellifera*) worden blootgesteld aan een aantal doses van de teststof opgelost in een geschikte drager, door rechtstreekse toediening aan de thorax (druppeltjes). De test duurt 48 uur. Indien het sterftepercentage tussen 24 uur en 48 uur stijgt, terwijl de sterfte in de controlegroep op een aanvaardbaar niveau blijft, d.w.z.  $\leq 10\%$ , is het gepast de duur van de test tot maximaal 96 uur te verlengen. De sterfte wordt dagelijks geregistreerd en met de controlewaarden vergeleken. De resultaten worden geanalyseerd om de LD<sub>50</sub> bij 24 uur en 48 uur te berekenen en, wanneer de studie wordt verlengd, bij 72 uur en 96 uur.

#### 1.4 VALIDITEIT VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig :

— aan het einde van de test mag de gemiddelde sterfte voor het totale aantal bijen in de controlegroepen niet meer dan 10 % bedragen;

— de LD<sub>50</sub> van de toxische standaard ligt binnen het gespecificeerde bereik.

#### 1.5 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

##### 1.5.1 Verzameling van de bijen

Voor de test worden jonge, volgroeide werkbijen gebruikt, d.w.z. bijen met dezelfde leeftijd, voedingsstatus, stam enz. De bijen moeten afkomstig zijn van voldoende gevoede, gezonde, zoveel mogelijk ziektevrije en van een goede koningin voorziene volken met een bekende geschiedenis en fysiologische status. Ze kunnen op de ochtend van het gebruik of de avond vóór de test worden gevangen en tot de volgende dag onder dezelfde omstandigheden als tijdens de proef worden gehouden. Bijen uit korven zonder broedsel zijn geschikt. Het is af te raden bijen vroeg in de lente of laat in de herfst te vangen, omdat ze in die periode een andere fysiologie hebben. Wanneer proeven vroeg in de lente of laat in de herfst uitgevoerd moeten worden, kunnen de bijen in een incubator worden gehouden en gedurende één week met « bijenbrood » (stuifmeel dat uit de honingraat is verzameld) en een sacharoseoplossing worden grootgebracht. Bijen die met chemische stoffen zijn behandeld, bv. met antibiotica of antivarroaproducten, mogen gedurende vier weken na beëindiging van de laatste behandeling niet voor toxiciteitstests worden gebruikt.

### 1.5.2 Huisvestings- en voedingsomstandigheden

De gebruikte korven moeten gemakkelijk te reinigen en goed geventileerd zijn. Elk geschikt materiaal kan worden gebruikt, bv. roestvrij staal, gaas, kunststof of wegwerphout. De grootte van de korven moet geschikt zijn voor het aantal bijen, d.w.z. ze moeten voldoende ruimte bieden. Groepen van tien bijen per korf verdienen de voorkeur.

De bijen moeten in een laboratoriumruimte onder donkere omstandigheden en bij een temperatuur van  $25 \pm 2$  °C worden gehouden. De relatieve vochtigheid, normaliter ca. 50-70 %, moet gedurende de test geregistreerd worden. Alle handelingen, waaronder behandeling en waarnemingen, kunnen bij (dag)licht worden verricht. Als voedsel wordt een sacharoseoplossing in water met een eindconcentratie van 500 g/l (50 % g/v) gebruikt, dat gedurende de testperiode met behulp van een voedselhouder ad libitum wordt verstrekt. Er kan een glazen buis (ca. 50 mm lang en 10 mm breed met aan het open uiteinde een versmalling van de diameter tot 2 mm) worden gebruikt.

### 1.5.3 Voorbereiding van de bijen

Voor de toediening van de teststof kunnen de verzamelde bijen met kooldioxide of stikstof worden verdoofd. De hoeveelheid gebruikt anestheticum en de blootstellingsduur moeten zo gering mogelijk zijn. Stervende bijen moeten voor aanvang van de proef worden vervangen door gezonde exemplaren.

### 1.5.4 Voorbereiding van de doses

De teststof moet als oplossing in een drager worden toegediend, d.w.z. een organisch oplosmiddel of een oplossing in water met een bevochtigingsmiddel. Als organisch oplosmiddel verdient aceton de voorkeur, maar er kunnen ook andere organische oplosmiddelen met een lage toxiciteit voor bijen worden gebruikt (bv. dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Voor kant-en-klare producten die in water gedispergeerd zijn en voor hoogpolaire organische stoffen die niet oplosbaar zijn in dragers van organische oplosmiddelen, kunnen oplossingen wellicht gemakkelijker worden toegediend wanneer ze worden voorbereid in een zwakke oplossing van een in de handel verkrijgbaar bevochtigingsmiddel (bv. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Er moeten geschikte controleoplossingen worden voorbereid, d.w.z. waarbij een oplos- of disperseermiddel wordt gebruikt om de teststof oplosbaar te maken. Er worden twee aparte controlegroepen gebruikt, één behandeld met water en één behandeld met het oplos-/disperseermiddel.

## 1.6 PROCEDURE

### 1.6.1 Test- en controlegroepen

Het aantal geteste doses en replicaties moet voldoen aan de statistische vereisten voor de bepaling van de LD<sub>50</sub> met de 95-% betrouwbaarheidsgrenzen. Normaliter zijn voor de test vijf doses nodig in een geometrische reeks, met een factor van ten hoogste 2,2, die alle waarden voor de LD<sub>50</sub> omvatten. Toch moet het aantal doses worden bepaald ten opzichte van de helling van de toxiciteitscurve (dosis/sterfte-curve), waarbij rekening moet worden gehouden met de statistische methode die voor de analyse van de resultaten is gekozen. Aan de hand van een verkennende proef kunnen de juiste doses worden gekozen.

Een dosis van elke testconcentratie wordt toegediend aan minimaal drie gelijke testgroepen, elk bestaande uit tien bijen.

Naast de testgroep moeten ten minste drie controlegroepen, elk bestaande uit tien bijen, worden gebruikt. Indien een organisch oplosmiddel of een bevochtigingsmiddel wordt gebruikt, moeten drie extra controlegroepen van elk tien bijen voor het oplos- of bevochtigingsmiddel worden opgenomen.

### 1.6.2 Toxische standaard

Bij de testreeks moet een toxische standaard worden toegepast. Er moeten ten minste drie doses worden gekozen om de verwachte LD<sub>50</sub>-waarde te dekken. Voor elke testdosis worden ten minste drie gelijke korven met elk tien bijen gebruikt. Als toxische standaard kan het best dimethoaat worden gebruikt, waarvan de geregistreerde orale LD<sub>50</sub>-24 uur tussen 0,10 en 0,30 µg a.s./bij ligt (2). Andere toxische standaarden zijn echter ook aanvaardbaar, voorzover voldoende gegevens verstrekt kunnen worden om de verwachte dosisrespons te kunnen verifiëren (bv. parathion).

### 1.6.3 Blootstelling

#### 1.6.3.1 Toediening van de doses

De verdoofde bijen worden individueel met de teststof behandeld (lokale toediening). De bijen worden willekeurig in de verschillende testdosis- en controlegroepen ingedeeld. Met een microapplicator wordt 1 µl van een oplossing met de teststof en de juiste concentratie in de dorsale zijde van de thorax van elke bij ingebracht. Ook andere volumes mogen gebruikt worden, maar moeten gerechtvaardigd worden. Na de toediening van de oplossing worden de bijen in de testkorven ingedeeld en voorzien van sacharoseoplossingen.

#### 1.6.3.2 Duur

De proef duurt bij voorkeur 48 uur. Indien de sterfte in de periode van 24 uur tot 48 uur meer dan 10 % stijgt, moet de proef tot maximaal 96 uur worden verlengd, mits de sterfte in de controlegroep niet meer dan 10 % bedraagt.

### 1.6.4 Waarnemingen

De sterfte wordt 4 uur na de toediening van de dosis en vervolgens na 24 uur en 48 uur geregistreerd. Wanneer de observatieperiode moet worden verlengd, moeten om de 24 uur, tot een maximum van 96 uur, verdere bepalingen worden uitgevoerd, mits de sterfte in de controlegroep niet hoger is dan 10 %.

Alle abnormale gedragseffecten die in de proefperiode worden waargenomen, moeten geregistreerd worden.

### 1.6.5 Limiettest

In sommige gevallen (bv. wanneer verwacht wordt dat een bepaalde teststof een lage toxiciteit heeft) kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 µg a.s./bij, om aan te tonen dat de LD<sub>50</sub> hoger is dan deze waarde. Deze procedure moet worden toegepast, inclusief drie gelijke testgroepen, voor de testdosis, de relevante controlegroepen, de bepaling van de verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel en het gebruik van de toxische standaard. Indien sterfte optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen (zie 1.6.4), dienen deze te worden vermeld.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 GEGEVENS

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere behandelingsgroep alsmede voor de controlegroep en de groep met de toxische standaard laten zien : het aantal gebruikte bijen, de sterfte op elk observatietijdstip en het aantal bijen dat abnormaal gedrag vertoont. De sterftcijfers worden met geschikte statistische methoden geanalyseerd (bv. probitmethode, voortschrijdend gemiddelde, binomiale waarschijnlijkheid) (3) (4). Maak dosis/respons-curven op elk aanbevolen observatietijdstip (d.w.z. 24 uur, 48 uur en, wanneer van toepassing, 72 uur en 96 uur) en bereken de hellingen van de curven en de mediaan letale dosis (LD<sub>50</sub>) met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4) (5). De LD<sub>50</sub> wordt uitgedrukt in µg teststof per bij.

### 2.2 VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

#### 2.2.1 Teststof :

- fysieke aard en fysisch-chemische eigenschappen (bv. stabiliteit in water, dampspanning);
- chemische identificatiegegevens, waaronder structuurformule, zuiverheid (d.w.z. voor pesticiden de identiteit en concentratie van de actieve stof(fen)).

#### 2.2.2 Diersoort :

- wetenschappelijke naam, stam, bij benadering de leeftijd (in weken), verzamelingsmethode, gegevens over de verzameling;
- informatie over de volken die gebruikt zijn voor de verzameling van de testbijen, inclusief gezondheid, ziekten bij volgroeide bijen, voorbehandeling enz.

#### 2.2.3 Proefomstandigheden :

- temperatuur en relatieve vochtigheid van de laboratoriumruimte;
- huisvestingsomstandigheden, inclusief soort, grootte en materiaal van de korven;
- methoden voor de toediening van de teststof, bv. gebruikte drager, gebruikt volume van de testoplossing en het gebruikte anestheticum;
- proefopzet, bv. aantal en gebruikte testdoses, aantal controlegroepen; voor elke testdosis en controlegroep het aantal gelijke korven en het aantal bijen per korf;
- datum van de proef.

#### 2.2.4 Resultaten :

- wanneer uitgevoerd de resultaten van een verkennend onderzoek;
- ruwe gegevens : sterfte bij elke geteste concentratie op elk observatietijdstip;
- grafiek van de dosis/respons-curven aan het einde van de test;
- LD<sub>50</sub>-waarden, met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, op elk van de aanbevolen observatietijdstippen, voor de teststof en de toxische standaard;
- statistische methoden die gebruikt zijn voor de bepaling van de LD<sub>50</sub>;
- sterfte in de controlegroepen;
- andere waargenomen of gemeten biologische effecten en elke abnormale respons van de bijen;
- elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

## 3. REFERENTIES

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp.151-165. March,1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.),1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp.99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp.265-267.



**C.18 : BEPALING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIE MET BEHULP VAN EEN BATCH-EVENWICHTSMETHODE****1. METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 106 van de OESO : bepaling van de adsorptie/desorptie met behulp van een batch-evenwichtsmethode (2000).

**1.1 INLEIDING**

In de methode is rekening gehouden met een rondzendproef en een workshop voor bodemselectie voor de ontwikkeling van een adsorptietest (1) (2) (3) (4) en met bestaande richtsnoeren op nationaal niveau (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptie/desorptie-onderzoek is nuttig om essentiële informatie te verkrijgen over de mobiliteit van chemische stoffen en hun verdeling in de compartimenten bodem, water en lucht van de biosfeer (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). De informatie kan worden gebruikt bij de prognose of raming van bijvoorbeeld de beschikbaarheid van een stof voor afbraak (22) (23), omzetting en opname door organismen (24); uitloging door het bodemprofiel (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); vluchtigheid vanuit de bodem (21) (29) (30); afspoeling van het landoppervlak naar natuurlijke wateren (18) (31) (32). Adsorptiegegevens kunnen worden gebruikt voor vergelijkende en modelberekeningen (19) (33) (34) (35).

De verdeling van een chemische stof tussen bodem- en waterfase is een complex proces dat wordt bepaald door verschillende factoren : de chemische aard van de stof (12) (36) (37) (38) (39) (40), de kenmerken van de bodem (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) en klimaatfactoren zoals regenval, temperatuur, zonlicht en wind. De talloze verschijnselen en mechanismen die een rol spelen bij de adsorptie van een stof door de bodem kunnen dan ook niet volledig worden opgenomen in een eenvoudig laboratoriummodel zoals de hier beschreven methode. Ook al is deze methode een benadering waarin niet alle mogelijkheden in het milieu worden bestreken, toch levert zij voldoende informatie op over de relevantie van de adsorptie van een stof vanuit milieuoogpunt.

Zie ook de algemene inleiding.

**1.2 TOEPASSINGSGBIED**

Met deze methode wordt getracht een raming van het adsorptie/desorptiegedrag van een stof ten opzichte van de bodem te bepalen. Het is de bedoeling een sorptiewaarde te verkrijgen die kan worden gebruikt om een prognose te doen omtrent de verdeling onder een scala van milieuomstandigheden; daartoe wordt de adsorptiecoëfficiënt bij evenwicht voor een chemische stof bij verschillende bodemtypes bepaald als functie van de bodemkenmerken (gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur, pH enz.). Er moeten verschillende bodemtypes worden gebruikt om de interactie van een bepaalde stof met in de natuur voorkomende bodemtypes zo breed mogelijk te kunnen bestrijken.

Bij deze methode wordt onder adsorptie het bindingsproces van chemische stoffen aan het bodemoppervlak verstaan; er wordt geen onderscheid gemaakt tussen verschillende adsorptieprocessen (fysische en chemische adsorptie) en bijvoorbeeld oppervlak-gekatalyseerde afbraak, bulkadsorptie of chemische reacties. Er wordt geen rekening gehouden met de adsorptie aan colloïd-deeltjes (diameter < 0,2 µm) die uit het bodemmonster ontstaan.

Als belangrijkste bodemparameters voor de adsorptie worden beschouwd : het gehalte aan organische koolstof (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); het gehalte aan klei en de bodemtextuur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) en de pH voor ioniseerbare verbindingen (3) (4) (42). Ook de effectieve capaciteit voor kationuitwisseling, het gehalte aan amorf ijzer en aluminiumoxides, met name voor vulkanische en tropische bodemtypes (4) en het specifieke oppervlak (49) kunnen een rol spelen.

De test is bedoeld om de adsorptie van een chemische stof aan verschillende bodemtypes met een uiteenlopend gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur en pH te bepalen en bestaat uit drie fasen :

**Fase 1 :** Voorbereidend onderzoek voor de bepaling van :

- de verhouding bodemmonster/oplossing;
- de voor de instelling van het adsorptie-evenwicht benodigde tijd en de hoeveelheid geadsorbeerde stof bij evenwicht;
- de adsorptie van de teststof aan het oppervlak van de gebruikte buizen of potten en de stabiliteit van de teststof gedurende de uitvoering van de test.

**Fase 2 :** Screening : de adsorptie wordt bij vijf verschillende bodemtypes onderzocht aan de hand van de adsorptiekinetiek bij één concentratie en de bepaling van de verdelingscoëfficiënt  $K_d$  en  $K_{oc}$ .

**Fase 3 :** Bepaling van de adsorptie-isothermen volgens Freundlich om na te gaan wat de invloed van de concentratie op de mate van adsorptie aan de bodem is.

Onderzoek van de desorptie aan de hand van de desorptiekinetiek/ desorptie-isothermen volgens Freundlich (zie aanhangsel).

## 1.3 DEFINITIES EN EENHEDEN

Symbool	Definitie	Eenheid
$A_{t_i}$	adsorptiepercentage op het tijdstip $t_i$	%
$A_{eq}$	adsorptiepercentage bij het adsorptie-evenwicht	%
$m_i^{ads}(t_i)$	massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof op het tijdstip $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_i^{ads}(\Delta t_i)$	massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof gedurende het tijdsinterval $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_i^{ads}(eq)$	aan het bodemmonster geadsorbeerde massa teststof bij het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g}$
$m_0$	massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de adsorptie-test	$\mu\text{g}$
$m_m^{ads}(t_i)$	massa van de teststof, gemeten in een monster ( $v_2^A$ ) op het tijdstip $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa van de teststof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g}$
$m_{soil}$	hoeveelheid van het bodemmonster, uitgedrukt in droge massa	g
$C_{st}$	massaconcentratie van de stockoplossing van de stof	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_0$	massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip $t = 0$	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massaconcentratie van de stof in de waterfase op het tijdstip $t_i$ waarop de analyse wordt uitgevoerd	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_i^{ads}(eq)$	gehalte aan de aan het bodemmonster geadsorbeerde stof bij het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massaconcentratie van de stof in de waterfase bij het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_0$	volume van de waterfase die tijdens de adsorptietest in contact met het bodemmonster is, op het tijdstip $t = 0$	$\text{cm}^3$
$v_2^A$	volume van het monster waarin de teststof wordt bepaald	$\text{cm}^3$
$K_d$	verdelingscoëfficiënt voor adsorptie	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{oc}$	genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{om}$	genormaliseerde verdelingscoëfficiënt voor organisch materiaal	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{ads}$	adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlich-exponent	
$D_{t_i}$	desorptiepercentage op het tijdstip $t_i$	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptiepercentage gedurende het tijdsinterval $\Delta t_i$	%
$K_{des}$	schijnbare desorptiecoëfficiënt	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_i^{des}$	desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip $t_i$	$\mu\text{g}$

Symbol	Definitie	Eenheid
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	massa van de uit het bodemonmonster gedesorbeerde teststof gedurende het tijdsinterval $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_m^{des}(eq)$	analytisch bepaalde massa van de stof in de waterfase bij het desorptie-evenwicht	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des}(eq)$	totale massa van de gedesorbeerde teststof bij het desorptie-evenwicht	$\mu\text{g}$
$m_s^{des}(\Delta t_j)$	massa van de stof die na het tijdsinterval $\Delta t_j$ aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^A$	massa van de stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht	$\mu\text{g}$
$C_s^{des}(eq)$	gehalte aan de stof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	massaconcentratie van de teststof in de waterfase bij het desorptie-evenwicht	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_T$	totaalvolume van de waterfase die tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment in contact met het bodemonmonster is	$\text{cm}^3$
$V_R$	volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume $\text{CaCl}_2$ -oplossing (0,01 M)	$\text{cm}^3$
$v_s^D$	volume van het monster dat op het tijdstip $t_i$ tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment voor analyse doeleinden wordt genomen	$\text{cm}^3$
$V_r^i$	volume van de oplossing die bij het desorptiekinetiek-experiment (parallele methode) voor de bepaling van de teststof uit buis (i) is genomen	$\text{cm}^3$
$V_r^f$	volume van de oplossing die voor de bepaling van de teststof bij het desorptie-evenwicht uit de buis is genomen	$\text{cm}^3$
MB	massabalans	%
$m_E$	totale massa van de teststof die in twee stappen uit het bodemonmonster en de wanden van de proefbuis is geëxtraheerd	$\mu\text{g}$
$V_{rec}$	volume van het supernatans dat na het adsorptie-evenwicht wordt verwijderd	$\text{cm}^3$
$P_{ow}$	verdelingscoëfficiënt octanol/water	
pKa	dissociatieconstante	
$S_w$	oplosbaarheid in water	$\text{g l}^{-1}$

#### 1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Bekende volumes van oplossingen van de teststof, al dan niet radioactief gelabeld, met een bekende concentratie in 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  worden toegevoegd aan bodemonsters met een bekend drooggewicht die vooraf zijn geëquilibreerd in 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ . Het mengsel wordt gedurende een geschikte tijd geschud. De bodemsuspensie wordt vervolgens door centrifugeren en desgewenst filteren gescheiden en de waterfase wordt geanalyseerd. De hoeveelheid aan het bodemonmonster geadsorbeerde teststof wordt berekend als het verschil tussen de hoeveelheid aanvankelijk in de oplossing aanwezige teststof en de hoeveelheid die aan het eind van het experiment is overgebleven (indirecte methode).

Het is ook mogelijk de hoeveelheid geadsorbeerde teststof rechtstreeks door bodemanalyse te bepalen (directe methode). Deze procedure, waarbij de bodemfractie stapsgewijs wordt geëxtraheerd met een geschikt oplosmiddel, wordt aanbevolen voor gevallen waarin het verschil in de concentratie van de stof in de oplossing niet nauwkeurig kan worden bepaald. Voorbeelden van dergelijke gevallen zijn: adsorptie van de teststof aan de wanden van het proefvat, instabiliteit van de teststof binnen de tijdschaal van het experiment, een geringe adsorptie die slechts kleine concentratieveranderingen in de oplossing veroorzaakt en een sterke adsorptie die leidt tot een zo lage concentratie dat deze niet nauwkeurig kan worden bepaald. Als een radioactief gelabelde stof wordt gebruikt, kan in plaats van bodemextractie worden gekozen voor bodemanalyse door verbranding en vloeistofscintillatietelling. Vloeistofscintillatietelling is echter een specifieke techniek waarbij geen onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorspronkelijke stof en omzettingproducten; deze techniek mag dan ook alleen worden gebruikt als de teststof gedurende het hele onderzoek stabiel is.

#### 1.5 INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

De gebruikte reagentia moeten chemisch zuiver (p.a.) zijn. Aanbevolen wordt ongelabelde teststoffen met een bekende samenstelling en bij voorkeur een zuiverheid van minimaal 95 % of radioactief gelabelde teststoffen met een bekende samenstelling en radioactieve zuiverheid te gebruiken. Wanneer tracers met een korte halveringstijd worden gebruikt, moet een vervalcorrectie worden uitgevoerd.

Voordat een adsorptie/desorptietest wordt uitgevoerd, moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn :

- a) de oplosbaarheid in water (A.6.);
- b) de dampspanning (A.4.) en/of de constante van de Wet van Henry;
- c) de niet-biologische afbraak : hydrolyse in afhankelijkheid van de pH (C.7.);
- d) de verdelingscoëfficiënt (A.8.);
- e) de « gemakkelijke » biologische afbreekbaarheid (C.4.) of de aerobe en anaerobe omzetting in de bodem;
- f) de pKa van ioniseerbare stoffen;
- g) de directe fotolyse in water (d.w.z. het UV/Vis-absorptiespectrum in water, kwantumopbrengst) en de fotodegradatie op de bodem.

#### 1.6 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De test kan worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid beschikbaar is. Een belangrijke parameter die de betrouwbaarheid van de resultaten kan beïnvloeden, met name wanneer de indirecte methode wordt gebruikt, is de stabiliteit van de teststof binnen de tijdschaal van de test. Een eerste vereiste is dan ook dat de stabiliteit tijdens een voorbereidend onderzoek wordt gecontroleerd; als er binnen de tijdschaal van de test een omzetting wordt waargenomen, wordt aanbevolen bij het hoofdonderzoek zowel de bodem- als de waterfase te analyseren.

Bij de uitvoering van deze test kunnen er problemen ontstaan met stoffen die slecht oplosbaar zijn in water ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ) en met stoffen met een hoge lading, aangezien de concentratie in de waterfase in dat geval niet met een voldoende nauwkeurigheid analytisch kan worden bepaald. In deze gevallen moeten er aanvullende maatregelen worden genomen. In de desbetreffende hoofdstukken van deze beschrijving wordt aangegeven hoe deze problemen kunnen worden aangepakt.

Bij het testen van vluchtige stoffen moet ervoor worden gezorgd dat verliezen tijdens de behandeling worden voorkomen.

#### 1.7 BESCHRIJVING VAN DE METHODE

##### 1.7.1 Apparatuur en reagentia

Standaard-laboratoriumapparatuur, met name :

- a) Buizen of potten voor de uitvoering van de experimenten. Het is belangrijk dat deze buizen of potten — direct in de centrifuge passen om fouten bij de behandeling en de overbrenging tot een minimum te beperken — van een inert materiaal zijn vervaardigd, zodat de adsorptie van de teststof aan het oppervlak tot een minimum wordt beperkt.
- b) Schudapparaat : overhead-schudder of gelijkwaardige apparatuur; het schudapparaat moet het bodemmonster tijdens het schudden in suspensie houden.
- c) Centrifuge : bij voorkeur met hoge snelheid, bijvoorbeeld >3000 g, instelbare temperatuur, in staat om deeltjes met een diameter van meer dan 0,2  $\mu\text{m}$  uit een waterige oplossing neer te slaan. De houders moeten tijdens het schudden en centrifugeren worden afgesloten om damp- en waterverlies te voorkomen; om adsorptie aan de dop tot een minimum te beperken moeten gedeactiveerde doppen worden gebruikt, zoals schroefdoppen met teflonbekleding.
- d) Facultatief : filterapparatuur; steriele wegwerpfilters met een porositeit van 0,2  $\mu\text{m}$ . Bij de keuze van het filtermateriaal moet goed worden opgelet, zodat verliezen van de teststof aan dit materiaal worden voorkomen; voor slecht oplosbare teststoffen wordt organisch filtermateriaal afgeraden.
- e) Analyse-instrumentarium dat geschikt is om de concentratie van de teststof te meten.
- f) Laboratoriumoven die kan worden ingesteld op een temperatuur van 103 °C tot 110 °C.

##### 1.7.2 Karakterisering en selectie van de bodem

De bodem moet worden gekarakteriseerd aan de hand van drie parameters die worden geacht grotendeels bepalend voor de adsorptiecapaciteit te zijn : gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur en pH. Zoals reeds is vermeld (zie « Toepassingsgebied »), kunnen ook andere fysisch-chemische eigenschappen van de bodem invloed hebben op de adsorptie/desorptie van een bepaalde stof en daarmee moet in die gevallen rekening worden gehouden.

De voor de karakterisering van de bodem gebruikte methoden zijn heel belangrijk en kunnen een significante invloed op de resultaten hebben. Daarom wordt aanbevolen de pH van de bodem in een 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-oplossing (de oplossing die bij de adsorptie/desorptietest wordt gebruikt) volgens de desbetreffende ISO-methode (ISO 10390-1) te bepalen. Tevens wordt aanbevolen de andere relevante bodemeigenschappen volgens de standaardmethoden (ISO-handboek voor bodemanalyse) te bepalen; in dat geval kunnen de sorptiegegevens op basis van algeheel gestandaardiseerde bodemparameters worden geanalyseerd. In de referenties (50-52) worden enige richtsnoeren gegeven voor bestaande standaardmethoden voor bodemanalyse en -karakterisering. Voor de kalibratie van bodemtestmethoden wordt het gebruik van referentiebodem aanbevolen.

Tabel 1 bevat richtsnoeren voor de selectie van bodemtypes voor adsorptie/desorptie-experimenten. De zeven vermelde bodemtypes bestrijken het scala dat in gematigde geografische zones voorkomt. Voor ioniseerbare teststoffen moeten de geselecteerde bodemtypes een breed pH-bereik beslaan om de adsorptie van de stof in geïoniseerde en niet-geïoniseerde vorm te kunnen bepalen. Onder punt 1.9 (« Uitvoering van de test ») worden richtsnoeren gegeven voor het aantal verschillende bodemtypes dat in de verschillende fasen van de test moet worden gebruikt.

Als de voorkeur wordt gegeven aan andere bodemtypes, moeten deze aan de hand van dezelfde parameters worden gekarakteriseerd en moet de spreiding van de eigenschappen vergelijkbaar zijn met die van tabel 1, ook al voldoen ze niet exact aan de criteria.

Tabel 1 : Richtsnoeren voor de selectie van bodemmonsters voor adsorptie/desorptie

Bodemtype	pH-bereik (in 0,01 M CaCl <sub>2</sub> )	Organisch koolstof- gehalte (%)	Kleigehalte (%)	Bodemtextuur (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	klei
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	kleileem
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	siltleem
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	leem
5	< 4,0 - 6,0 (2)	< 0,5 - 1,5 (2)(3)	< 10 - 15 (2)	lemig zand
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 (2)(3)	40 - 65	kleileem/klei
7	< 4,5	> 10	< 10	zand/lemig zand

(1) Volgens het systeem van de FAO en de VS (85).

(2) De waarde van deze variabelen moet bij voorkeur binnen het vermelde bereik vallen. Als het echter moeilijk is geschikt bodemmateriaal te vinden, is ook een waarde beneden het vermelde minimum aanvaardbaar.

(3) Bodem met minder dan 0,3 % organische koolstof kan de correlatie tussen het gehalte aan organisch materiaal en de adsorptie verstoren. Het verdient dan ook aanbeveling bodem met minimaal 0,3 % organische koolstof te gebruiken.

### 1.7.3 Monsterneming en opslag van bodemmonsters

#### 1.7.3.1 Monsterneming

Er worden geen specifieke technieken of gereedschappen voor monsterneming aanbevolen; de monsternemings-techniek is afhankelijk van het doel van het onderzoek (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Er moet rekening worden gehouden met de volgende overwegingen :

a) Er moet gedetailleerde achtergrondinformatie over de veldlocatie zijn; daarbij gaat het bijvoorbeeld om de ligging, de vegetatie, behandelingen met pesticiden en/of kunstmest, biologische toevoegingen of onopzettelijke verontreiniging. De aanbevelingen van de ISO-norm voor bodembemonstering (ISO 10381-6) moeten bij de beschrijving van de bemonsteringslocatie in acht worden genomen.

b) De bemonsteringslocatie moet worden gespecificeerd met UTM (Universele Transversale Mercatorprojectie / European Horizontal Datum) of geografische coördinaten; daardoor kan een bepaalde bodem in de toekomst opnieuw worden bemonsterd of kan een betere specificatie van de bodem worden gegeven binnen de uiteenlopende classificatiesystemen die in de verschillende landen worden gebruikt. Tevens mogen monsters alleen in een A-horizont tot maximaal 20 cm diep worden genomen. Met name bij bodemtype nr. 7 moet een O<sub>n</sub>-horizont, als deze in de bodem aanwezig is, in het monster worden opgenomen.

De houders waarin en de temperatuur waarbij de bodemmonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat significante wijzigingen in de aanvankelijke bodemeigenschappen uitgesloten zijn.

#### 1.7.3.2 Opslag

Het gebruik van verse bodemmonsters verdient de voorkeur. Alleen als dit niet mogelijk is, moeten de monsters bij kamertemperatuur en luchtdroog worden bewaard. Er is geen aanbevolen houdbaarheidstermijn, maar monsters die meer dan drie jaar zijn bewaard moeten vóór gebruik opnieuw worden geanalyseerd op hun gehalte aan organische koolstof, pH en capaciteit voor kationuitwisseling.

#### 1.7.3.3 Behandeling en voorbereiding van bodemmonsters voor de test

De bodemmonsters worden bij kamertemperatuur (bij voorkeur 20-25 °C) aan de lucht gedroogd. Bij het losmaken moet zo weinig mogelijk kracht worden gebruikt om de oorspronkelijke textuur van de bodem zo veel mogelijk intact te houden. De monsters worden gezeefd tot een deeltjesgrootte ≤ 2 mm; bij het zeven moeten de aanbevelingen van de ISO-norm voor bodembemonstering (ISO 10381-6) worden opgevolgd. Een zorgvuldige homogenisering wordt aanbevolen, aangezien de reproduceerbaarheid van de resultaten daardoor wordt bevorderd. Het vochtgehalte van de bodem wordt bij drie monsters bepaald door verhitting op 105 °C tot constant gewicht (ongeveer 12 uur). Bij alle berekeningen wordt onder de massa van het bodemmonster het drooggewicht verstaan, d.w.z. de voor het vochtgehalte gecorrigeerde massa.

#### 1.7.4 Voorbereiding van de teststof voor de toevoeging aan de bodemmonsters

De teststof wordt opgelost in 0,01 M CaCl<sub>2</sub> in gedestilleerd of gedeïoniseerd water; de CaCl<sub>2</sub>-oplossing wordt als waterfase gebruikt om het centrifugeren te vergemakkelijken en de kationuitwisseling tot een minimum te beperken. De concentratie van de stockoplossing moet bij voorkeur drie ordes van grootte hoger zijn dan de detectiegrens van de gebruikte analysemethode. Deze drempel vormt een waarborg voor nauwkeurige metingen bij de hier gevolgde methode; daarnaast moet de concentratie van de stockoplossing lager zijn dan de oplosbaarheid van de teststof in water.

De stockoplossing moet bij voorkeur vlak voor de toevoeging aan het bodemmonster worden bereid en moet afgesloten in het donker bij 4 °C worden bewaard. De houdbaarheidstermijn is afhankelijk van de stabiliteit van de teststof en de concentratie in de oplossing.

Alleen bij slecht oplosbare stoffen ( $S_w < 10^{-4} \text{ gl}^{-1}$ ) kan, als het moeilijk is de teststof op te lossen, een solubilisator nodig zijn. Deze solubilisator : (a) moet mengbaar zijn met water, zoals methanol of acetonitril; (b) mag niet in een hogere concentratie dan 1 % van het totale volume van de stockoplossing aanwezig zijn en de concentratie in de oplossing van de teststof die met het bodemmonster in contact komt moet lager zijn (bij voorkeur lager dan 0,1 %); en (c) mag geen oppervlakte-actieve stof zijn en geen solvolyse-reactie met de teststof aangaan. Het gebruik van een solubilisator moet bij de rapportage van de gegevens worden vermeld en gemotiveerd.

Slecht oplosbare stoffen kunnen ook door « spiking » aan het testsysteem worden toegevoegd : de teststof wordt opgelost in een organisch oplosmiddel en een hoeveelheid daarvan wordt toegevoegd aan het systeem met het bodemmonster en de 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-oplossing in gedestilleerd of gedeïoniseerd water. Het gehalte van de waterfase aan organisch oplosmiddel moet zo laag mogelijk worden gehouden, normaal gesproken maximaal 0,1 %. « Spiking » uit een organisch oplosmiddel kan als nadeel hebben dat de reproduceerbaarheid qua volume slecht is. Dit betekent dat er sprake is van een extra fout, aangezien de concentratie van de teststof en het co-oplosmiddel niet bij alle tests gelijk is.



1.8 VOORWAARDEN WAARAAN DE UITVOERING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIETEST MOET VOLDOEN

1.8.1 De analysemethode

De belangrijkste parameters die de nauwkeurigheid van de sorptiemetingen kunnen beïnvloeden zijn : de nauwkeurigheid van de analysemethode voor zowel de opgeloste als de geadsorbeerde fase, de stabiliteit en zuiverheid van de teststof, het bereiken van het sorptie-evenwicht, de omvang van de concentratieverandering in de oplossing, de verhouding bodemmonster/oplossing en de veranderingen in de bodemstructuur tijdens de instelling van het evenwicht (35) (59-62). Aanhangsel 2 bevat enkele voorbeelden die relevant zijn voor de nauwkeurigheid.

De betrouwbaarheid van de gebruikte analysemethode moet worden gecontroleerd op het concentratiebereik dat bij de test wordt verwacht. Het staat de experimentator volledig vrij een geschikte methode te ontwikkelen waarvan de nauwkeurigheid, de precisie, de reproduceerbaarheid, de detectiegrenzen en de recovery aan de eisen voldoen. In het volgende experiment worden richtsnoeren voor de uitvoering van een dergelijke test gegeven.

Een geschikt volume 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, bijvoorbeeld 100 cm<sup>3</sup>, wordt gedurende 4 uur geschud met een hoeveelheid, bijvoorbeeld 20 g, van een sterk adsorberend bodemtype, d.w.z. met een hoog gehalte aan organische koolstof en klei; het gebruikte gewicht en volume kan aan de behoefte worden aangepast, maar een verhouding bodemmonster/oplossing van 1 : 5 is een goed uitgangspunt. Het mengsel wordt gecentrifugeerd en de waterfase kan worden gefiltreerd. Aan deze fase wordt een bekend volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om te zorgen dat de nominale concentratie binnen het bereik ligt dat bij de test wordt verwacht. Om de aard van de oplossing zo weinig mogelijk te veranderen mag dit volume niet groter zijn dan 10 % van het uiteindelijke volume van de waterfase. De oplossing wordt geanalyseerd.

Om artefacten in de analysemethode en matrixeffecten van de bodem op te sporen moet één blanco-bepaling met bodemmonster + CaCl<sub>2</sub>-oplossing (zonder teststof) worden uitgevoerd.

Voor sorptiemetingen kunnen bijvoorbeeld de volgende analysemethoden worden gebruikt : gaschromatografie (GLC), hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC), spectrometrie (b.v. GC/massaspectrometrie of HPLC/massaspectrometrie) en vloeistofscintillatietelling (voor radioactief gelabelde stoffen). Onafhankelijk van de gebruikte analysemethode wordt deze geschikt geacht als de recovery tussen 90 % en 110 % van de nominale waarde ligt. Om detectie en evaluatie na de faseverdeling mogelijk te maken moeten de detectiegrenzen van de analysemethode tenminste twee ordes van grootte onder de nominale concentratie liggen.

De kenmerken en detectiegrenzen van de beschikbare analysemethode voor het adsorptie-onderzoek spelen een belangrijke rol bij de bepaling van de testomstandigheden en de hele praktische uitvoering van de test. In de hier gegeven beschrijving wordt een algemene route vermeld en worden aanbevelingen en richtsnoeren gegeven voor andere oplossingen wanneer de analysemethode en de omstandigheden in het laboratorium beperkingen opleggen.

1.8.2 De keuze van een optimale verhouding bodemmonster/oplossing

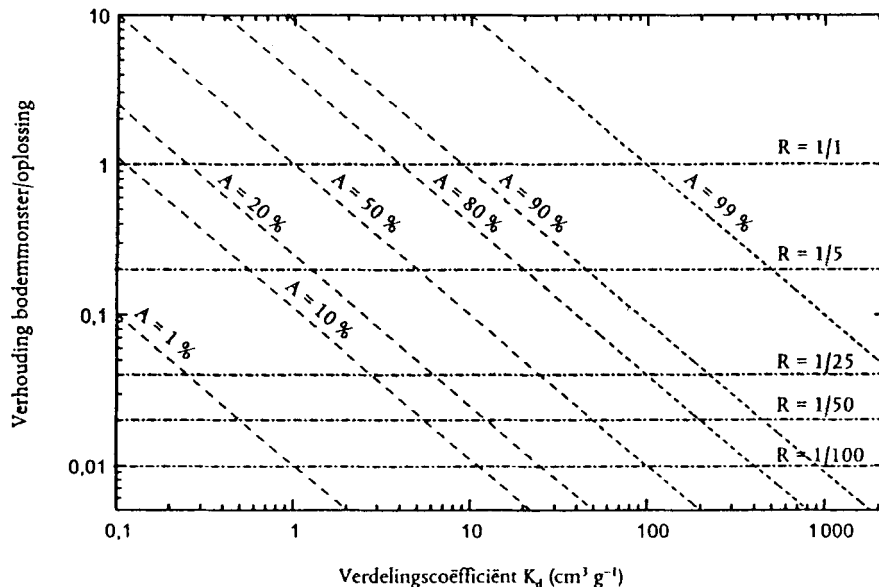
De keuze van een geschikte verhouding bodemmonster/oplossing voor het sorptie-onderzoek wordt bepaald door de verdelingscoëfficiënt K<sub>d</sub> en de gewenste relatieve adsorptie. De verandering van de concentratie van de stof in de oplossing bepaalt de statistische nauwkeurigheid van de meting op basis van de vorm van de adsorptievergelijking en de beperkingen van de analysemethode bij de bepaling van de concentratie van de stof. Daarom is het meestal verstandig een aantal vaste verhoudingen te kiezen waarbij de adsorptie hoger is dan 20 % en liefst hoger dan 50 % (62), terwijl erop moet worden gelet dat de concentratie van de teststof in de waterfase hoog genoeg blijft om nauwkeurig te kunnen worden gemeten. Dit is vooral belangrijk bij hoge adsorptiepercentages.

Een geschikte manier om de juiste verhouding bodemmonster/waterfase te kiezen is op basis van een raming van de K<sub>d</sub>-waarde door voorbereidend onderzoek of erkende schattingstechnieken (zie aanhangsel 3). Vervolgens kan een geschikte verhouding worden gekozen op basis van een grafiek waarin de verhouding bodemmonster/oplossing bij vaste adsorptiepercentages is uitgezet tegen de K<sub>d</sub> (zie figuur 1). In deze grafiek wordt uitgegaan van een lineaire adsorptievergelijking (1). Het verband wordt verkregen door vergelijking (4) voor de K<sub>d</sub> te herschikken tot vergelijking (2) :

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left( \frac{m_0}{m_i^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \tag{1}$$

of in de logaritmische vorm, uitgaande van  $R = m_{soil}/V_0$  en  $A_{eq}\%/100 = \frac{m_i^{ads}(eq)}{m_0}$  :

$$\log R = - \log K_d + \log \left[ \frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \tag{2}$$



**Figuur 1** : Verband tussen de verhouding bodemmonster/oplossing en  $K_d$  bij verschillende adsorptiepercentages.

Figuur 1 geeft een overzicht van de vereiste verhouding bodemmonster/oplossing als functie van  $K_d$  bij verschillende adsorptiepercentages. Zo wordt bij een verhouding 1 : 5 en een  $K_d$  van 20 ongeveer 80 % van de teststof geadsorbeerd. Om bij dezelfde  $K_d$  een adsorptie van 50 % te krijgen moet een verhouding van 1 : 25 worden gebruikt. Als de geschikte verhouding bodemmonster/oplossing op deze manier wordt gekozen, geeft dit de nodige flexibiliteit om aan de experimentele behoeften te voldoen.

De gevallen waarin de chemische stof sterk of nauwelijks wordt geadsorbeerd, leveren meer problemen op. Bij een geringe adsorptie wordt een verhouding bodemmonster/oplossing van 1 : 1 aanbevolen, hoewel bij sommige zeer organische bodemtypes een lagere verhouding nodig kan zijn om een suspensie te verkrijgen. Bij de meting van kleine veranderingen in de concentratie in de oplossing moet zorgvuldig naar de analysemethode worden gekeken om te voorkomen dat de adsorptiemeting onnauwkeurig wordt. Anderzijds kan bij een zeer hoge verdelingscoëfficiënt  $K_d$  de verhouding bodemmonster/oplossing worden opgevoerd tot wel 1 : 100 om ervoor te zorgen dat er een significante hoeveelheid van de stof in de oplossing achterblijft. Er moet echter voor een goede menging worden gezorgd en het systeem moet voldoende tijd krijgen voor de instelling van het evenwicht. Een andere aanpak is schatting van de  $K_d$ -waarde met behulp van ramingstechnieken op basis van bijvoorbeeld de  $P_{ow}$ -waarde (zie aanhangsel 3). Dit kan met name nuttig zijn bij slecht geadsorbeerde/polaire stoffen met een  $P_{ow} < 20$  en lipofiele/sterk geadsorbeerde stoffen met een  $P_{ow} > 10^4$ .

## 1.9 UITVOERING VAN DE TEST

### 1.9.1 Testomstandigheden

Alle experimenten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur en indien mogelijk bij een constante temperatuur tussen 20 °C en 25 °C.

Bij het centrifugeren moeten de omstandigheden zodanig zijn dat deeltjes groter dan 0,2 µm uit de oplossing kunnen worden verwijderd. Dit zijn de kleinste deeltjes die als vaste deeltjes worden beschouwd; beneden deze grenswaarde vallen ze in de categorie colloid-deeltjes. Aanhangsel 4 bevat richtsnoeren om de centrifugeeromstandigheden te bepalen.

Als het centrifugeren niet zodanig kan gebeuren dat de verwijdering van grotere deeltjes dan 0,2 µm wordt gewaarborgd, moet een combinatie van centrifugeren en filtreren met filters van 0,2 µm worden gebruikt. Deze filters moeten van een geschikt inert materiaal zijn vervaardigd om verliezen van de teststof daaraan te voorkomen. In elk geval moet worden aangetoond dat er bij het filtreren geen teststof verloren gaat.

### 1.9.2 Fase 1 : Voorbereidend onderzoek

Het doel van de uitvoering van een voorbereidend onderzoek is al in het hoofdstuk « Toepassingsgebied » beschreven. In onderstaande beschrijving worden richtsnoeren gegeven voor de wijze waarop een dergelijk experiment kan worden opgezet.

#### 1.9.2.1 Selectie van de optimale verhouding bodemmonster/oplossing

Er worden twee bodemtypes en drie verhoudingen bodemmonster/oplossing gebruikt (zes experimenten). Eén bodemtype heeft een hoog gehalte aan organische koolstof en een laag kleigehalte en het andere een laag gehalte aan organische koolstof en een hoog kleigehalte. De volgende verhoudingen worden aangeraden :

- 50 g bodemmonster en 50 cm<sup>3</sup> oplossing van de teststof in water (verhouding 1 : 1);
- 10 g bodemmonster en 50 cm<sup>3</sup> oplossing van de teststof in water (verhouding 1 : 5);
- 2 g bodemmonster en 50 cm<sup>3</sup> oplossing van de teststof in water (verhouding 1 : 25).

De minimale hoeveelheid bodemmonster waarmee het experiment kan worden uitgevoerd, is afhankelijk van de mogelijkheden van het laboratorium en de gebruikte analysemethode. Om betrouwbare resultaten te krijgen wordt echter aangeraden minimaal 1 g en bij voorkeur 2 g te gebruiken.

Eén controlemonster met uitsluitend de teststof in 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-oplossing (zonder bodemmonster) wordt aan exact dezelfde behandeling onderworpen als de testsystemen om de stabiliteit van de teststof in de CaCl<sub>2</sub>-oplossing en de mogelijke adsorptie aan de wanden van het proefvat te controleren.

Voor elk bodemtype wordt één blanco-bepaling met dezelfde hoeveelheid bodemmonster en een totaalvolume van 50 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-oplossing (zonder teststof) op dezelfde wijze behandeld. Deze bepaling fungeert als achtergrond tijdens de analyse om storende stoffen of verontreinigde bodem te kunnen signaleren.

Alle experimenten, ook de controle- en blanco-bepalingen, moeten minimaal in duplo worden uitgevoerd. Het totale aantal monsters dat voor het onderzoek nodig is, kan aan de hand van de gevolgde methode worden bepaald.

In het algemeen worden voor het voorbereidend onderzoek en het hoofdonderzoek dezelfde methoden gebruikt. Uitzonderingen op deze regel worden waar nodig vermeld.

De aan de lucht gedroogde bodemmonsters worden geëquilibreerd door de nacht vóór de dag van het experiment (gedurende 12 uur) te schudden met een minimaal volume van 45 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-oplossing. Vervolgens wordt een bepaald volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om het uiteindelijke volume op 50 cm<sup>3</sup> te brengen. Dit toegevoegde volume stockoplossing : (a) mag niet groter zijn dan 10 % van het uiteindelijke volume van de waterfase van 50 cm<sup>3</sup> om de aard van de oplossing vóór equilibreren zo weinig mogelijk te veranderen en (b) moet bij voorkeur leiden tot een beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemmonster ( $C_0$ ) die ten minste twee ordes van grootte hoger ligt dan de detectiegrens van de analysemethode; deze drempelwaarde waarborgt dat er ook bij een hoge adsorptie (> 90 %) nauwkeurige metingen kunnen worden uitgevoerd en dat later de adsorptie-isothermen kunnen worden bepaald. Tevens wordt indien mogelijk een lagere beginconcentratie van de stof ( $C_0$ ) dan de helft van de oplosbaarheids grens aanbevolen.

De concentratie van de stockoplossing ( $C_{st}$ ) kan analoog aan het volgende voorbeeld worden berekend : Uitgaande van een detectiegrens van 0,01 µg cm<sup>-3</sup> van 90 % en een adsorptie van 90 % moet de beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemmonster bij voorkeur 1 µg cm<sup>-3</sup> zijn (twee ordes van grootte hoger dan de detectiegrens). Wanneer het maximale aanbevolen volume van de stockoplossing wordt toegevoegd, d.w.z. 5 cm<sup>3</sup> aan 45 cm<sup>3</sup> geëquilibreerde 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-oplossing (= 10 % van de stockoplossing t.o.v. het totaalvolume van de waterfase van 50 cm<sup>3</sup>), moet de concentratie van de stockoplossing 10 µg cm<sup>-3</sup> zijn; dit is drie ordes van grootte hoger dan de detectiegrens van de analysemethode.

De pH van de waterfase moet voor en na het contact met het bodemmonster worden gemeten, aangezien deze een belangrijke rol bij het hele adsorptieproces speelt, met name bij ioniseerbare stoffen.

Het mengsel wordt geschud totdat het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld. De daarvoor benodigde tijd varieert sterk, afhankelijk van de stof en het bodemmonster; meestal volstaat een periode van 24 uur (77). Aanbevolen wordt tijdens het voorbereidend onderzoek gedurende een schudperiode van 48 uur achtereenvolgens verschillende monsters te nemen (b.v. na 4, 8, 24 en 48 uur). De analysetijdstippen moeten echter gelet op het werkschema in het laboratorium flexibel worden gehanteerd.

Er zijn twee mogelijkheden voor de analyse van de teststof in de waterige oplossing : (a) de parallelle methode en (b) de seriële methode. Met nadruk moet worden gesteld dat de parallelle methode weliswaar experimenteel omslachtiger is, maar dat de mathematische behandeling van de resultaten eenvoudiger is (zie aanhangsel 5). De keuze van de gevolgde methode wordt echter aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

(a) Parallelle methode : per tijdsinterval waarvoor de adsorptiekinetiek wordt onderzocht, wordt een mengsel met dezelfde verhouding bodemmonster/oplossing bereid. Na bijvoorbeeld 4 uur wordt de waterfase na centrifugeren en desgewenst filteren zo volledig mogelijk uit de eerste buis verwijderd en vervolgens gemeten; na bijvoorbeeld 8 uur gebeurt dit voor de tweede buis, na 24 uur voor de derde buis enz.

(b) Seriële methode : voor elke verhouding bodemmonster/oplossing wordt slechts één mengsel in duplo bereid. Op vooraf bepaalde tijdstippen wordt het mengsel gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. In een kleine hoeveelheid van de waterfase wordt de teststof onmiddellijk geanalyseerd; vervolgens gaat het experiment verder met het oorspronkelijke mengsel. Als na het centrifugeren wordt gefiltreerd, moet filtratie van kleine hoeveelheden waterige oplossing in het laboratorium mogelijk zijn. Om te zorgen dat de verhouding bodemmonster/oplossing niet significant verandert en de voor adsorptie beschikbare hoeveelheid oplossing tijdens de test niet afneemt, wordt aanbevolen in totaal niet meer dan 1 % van het totale volume van de oplossing voor de analyses te gebruiken.

Het adsorptiepercentage  $A_t$  wordt op elk tijdstip  $t_i$  berekend op basis van de nominale beginconcentratie en de gemeten concentratie op het bemonsteringstijdstip  $t_i$  en gecorrigeerd voor de waarde van de blanco-bepaling. De  $A_t$  wordt uitgezet tegen de tijd (zie figuur 1 in aanhangsel 5) om te bepalen wanneer het evenwicht wordt bereikt (<sup>2</sup>). Tevens wordt de  $K_d$ -waarde bij evenwicht berekend. Op basis van deze  $K_d$ -waarde worden geschikte verhoudingen bodemmonster/oplossing uit figuur 1 gekozen, zodat het adsorptiepercentage hoger dan 20 % en bij voorkeur hoger dan 50 % is (61). Alle vergelijkingen en beginselen voor het tekenen van de curve worden vermeld in het hoofdstuk over Gegevens en rapportage en in aanhangsel 5.

#### 1.9.2.2 Bepaling van de equilibratietijd voor adsorptie en de bij evenwicht geadsorbeerde hoeveelheid teststof

Zoals reeds is vermeld, kan aan de hand van curves waarin  $A_t$  of  $C_{aq}^{ads}$  tegen de tijd wordt uitgezet, worden bepaald wanneer het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld en hoeveel teststof bij evenwicht is geadsorbeerd. De figuren 1 en 2 in aanhangsel 5 zijn voorbeelden van dergelijke curves. De equilibratietijd is de tijd die het systeem nodig heeft om stationair te worden.

Indien bij een bepaald bodemmonster de curve niet horizontaal gaat lopen maar blijft stijgen, kan dit worden veroorzaakt door complicerende factoren zoals biologische afbraak of trage diffusie. Biologische afbraak kan worden aangetoond door het experiment te herhalen met een gesteriliseerd bodemmonster. Als zich ook in dat geval geen evenwicht instelt, moet er worden gezocht naar andere verschijnselen die zich in dat specifieke geval kunnen voordoen; dit kan gebeuren door de experimentele omstandigheden (temperatuur, schudtijd, verhouding bodemmonster/oplossing) te wijzigen. De experimentator moet zelf bepalen of het zinvol is de testprocedure verder uit te voeren, ook al zal zich wellicht geen evenwicht instellen.

#### 1.9.2.3 Adsorptie aan het oppervlak van het proefvat en stabiliteit van de teststof

Enige informatie over de adsorptie van de teststof aan het oppervlak van de proefvaten en over de stabiliteit van de stof kan uit een analyse van de controlemonsters worden afgeleid. Als er meer stof verdwijnt dan de standaardafwijking van de analysemethode, kan er sprake zijn van niet-biologische afbraak en/of adsorptie aan het oppervlak van het proefvat. Deze verschijnselen kunnen van elkaar worden onderscheiden door de wanden van het proefvat grondig te wassen met een bekend volume van een geschikt oplosmiddel en de wasvloeistof op de teststof te analyseren. Als er geen adsorptie aan het oppervlak van het proefvat wordt waargenomen, wijst het verdwijnen van de teststof op niet-biologische afbraak. Als er wel adsorptie wordt geconstateerd, moeten er proefvaten van een ander materiaal worden gebruikt. De bij dit experiment verkregen gegevens over de adsorptie aan het oppervlak van de proefvaten kunnen echter niet rechtstreeks naar het experiment met bodemmonster/oplossing worden geëxtrapoleerd, aangezien deze adsorptie door de aanwezigheid van het bodemmonster wordt beïnvloed.

Aanvullende informatie over de stabiliteit van de teststof kan worden verkregen door de bepaling van de massabalans van de teststof in de loop van de tijd. Dit betekent dat de waterfase, bodemextracten en de wanden van het proefvat op de teststof worden geanalyseerd. Het verschil tussen de toegevoegde massa en de som van de hoeveelheden die in de waterfase en bodemextracten en aan de wanden van het proefvat worden teruggevonden, is gelijk aan de afgebroken en/of verdampde en/of niet-geëxtraheerde hoeveelheid. Om een massabalans te kunnen bepalen moet het adsorptie-evenwicht zich binnen de periode waarin het experiment wordt uitgevoerd, hebben ingesteld.

De massabalans wordt bepaald voor beide bodemtypes en één verhouding bodemmonster/oplossing per bodemtype waarbij de depletie bij evenwicht hoger is dan 20 % en bij voorkeur hoger dan 50 %. Wanneer het experiment om de verhouding te bepalen wordt afgerond met de analyse van het laatste monster van de waterfase na 48 uur, worden de fasen door centrifugeren en desgewenst filteren gescheiden. De waterfase wordt zo volledig mogelijk verwijderd en aan de bodemfase wordt een geschikt oplosmiddel (een extractiecoëfficiënt van minimaal 95 %) toegevoegd om de teststof te extraheren. Aanbevolen wordt deze extractie tenminste twee maal na elkaar uit te voeren. De hoeveelheid teststof in het bodem- en het proefvatextract wordt gemeten en de massabalans wordt bepaald (zie vergelijking 10 in het hoofdstuk Gegevens en rapportage). Als de massabalans lager is dan 90 %, wordt de teststof geacht binnen de tijdschaal van de test instabiel te zijn. Het onderzoek kan dan wel worden voortgezet, mits echter rekening wordt gehouden met de instabiliteit van de teststof; in dit geval wordt aanbevolen in het hoofdonderzoek beide fasen te analyseren.

#### 1.9.3. Fase 2 : Adsorptiekinetiek bij één concentratie van de teststof

Er worden vijf bodemtypes gebruikt, die uit tabel 1 worden gekozen. Indien mogelijk verdient het aanbeveling enkele of alle bodemtypes uit het voorbereidende onderzoek te gebruiken, omdat in dat geval fase 2 voor deze bodemtypes niet hoeft te worden herhaald.

Op basis van de resultaten van het voorbereidend onderzoek worden de equilibratietijd, de verhouding bodemmonster/oplossing, het gewicht van het bodemmonster, het volume van de waterfase in contact met het bodemmonster en de concentratie van de teststof in de oplossing gekozen. Analyse moet bij voorkeur gebeuren na ongeveer 2, 4, 6, 8 (indien mogelijk ook 10) en 24 uur contacttijd; de schudtijd kan tot maximaal 48 uur worden verlengd, wanneer is gebleken dat een stof een langere equilibratietijd vergt. De analysetijdstippen kunnen echter met enige flexibiliteit worden bepaald.

Elk experiment (één bodemmonster en één oplossing) wordt tenminste in duplo uitgevoerd om de spreiding van de resultaten te kunnen bepalen. In elk experiment wordt één blanco-bepaling opgenomen. Daarbij worden dezelfde massa bodemmonster en hetzelfde volume 0,01 M  $CaCl_2$ -oplossing (zonder teststof) als bij het experiment gebruikt. Een controlemonster met alleen de teststof in 0,01 M  $CaCl_2$ -oplossing (zonder bodemmonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen om onverwachte afwijkingen te kunnen constateren.

Het adsorptiepercentage wordt op elk tijdstip ( $A_t$ ) en/of over elk tijdsinterval ( $A_{\Delta t_i}$ ) berekend (al naar behoefte) en tegen de tijd uitgezet. Tevens worden de verdelingscoëfficiënt  $K_d$  bij evenwicht en de genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof  $K_{oc}$  (voor apolaire organische stoffen) berekend.



Resultaten van de bepaling van de adsorptiekinetiek

De lineaire  $K_d$ -waarde is meestal een nauwkeurige beschrijving van het sorptiegedrag in de bodem (35) (78) en geeft de inherente mobiliteit van chemische stoffen in de bodem aan. Zo worden chemische stoffen met een  $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  in het algemeen als mobiel beschouwd. Ook op basis van de  $K_{oc}$ -waarden is een indelingssysteem voor de mobiliteit opgezet door MacCall et al. (16). Daarnaast zijn er indelingssystemen voor de uitloging op basis van een verband tussen  $K_{oc}$  en DT-50 (3) (32) (79).

Op basis van een foutenanalyse (61) is geconcludeerd dat  $K_d$ -waarden lager dan  $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  niet nauwkeurig kunnen worden bepaald aan de hand van een afname van de concentratie in de waterfase, zelfs als de (met het oog op de nauwkeurigheid) gunstigste verhouding bodemonster/oplossing, d.w.z. 1 : 1, wordt gebruikt. In dit geval wordt een analyse van beide fasen, zowel bodem als oplossing, aanbevolen.

Gelet op bovenstaande opmerkingen wordt aanbevolen het onderzoek naar het adsorptiegedrag van een chemische stof in de bodem en zijn potentiële mobiliteit uit te breiden met een bepaling van de adsorptie-isothermen volgens Freundlich, wanneer een nauwkeurige bepaling van  $K_d$  met het hier beschreven experimentele protocol mogelijk is. Een nauwkeurige bepaling is mogelijk als vermenigvuldiging van  $K_d$  met de verhouding bodemonster/oplossing een getal groter dan 0,3 oplevert wanneer de daling van de concentratie in de waterfase wordt gemeten (indirecte methode) of een getal groter dan 0,1 wanneer beide fasen worden geanalyseerd (directe methode) (61).

### 1.9.4. Fase 3 : Adsorptie-isothermen en desorptiekinetiek/desorptie-isothermen

#### 1.9.4.1. Adsorptie-isothermen

Er worden vijf concentraties van de teststof gebruikt, die bij voorkeur twee ordes van grootte beslaan; bij de keuze van deze concentraties moet rekening worden gehouden met de oplosbaarheid in water en de resulterende evenwicht-concentraties in de waterfase. Per bodemonster moet in het hele onderzoek dezelfde verhouding bodem/oplossing worden gebruikt. De adsorptietest wordt volgens bovenstaande methode uitgevoerd, met als enige verschil dat de waterfase slechts éénmaal wordt geanalyseerd op het tijdstip waarop het evenwicht zich heeft ingesteld, zoals bepaald tijdens fase 2. De evenwichtsconcentraties in de oplossing worden bepaald en de geadsorbeerde hoeveelheid wordt aan de hand van de afname van de hoeveelheid teststof in de oplossing berekend of met de directe methode bepaald. De geadsorbeerde massa teststof per massa-eenheid bodemonster wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage).

Resultaten van de bepaling van de adsorptie-isotherm

Van de tot op heden gesuggereerde mathematische modellen voor de adsorptie wordt voor de beschrijving van het adsorptieproces meestal de Freundlich-isotherm gebruikt. Gedetailleerdere informatie over de interpretatie en relevantie van adsorptiemodellen is te vinden in de referenties (41) (45) (80) (81) (82).

**NB** : Er dient te worden opgemerkt dat een vergelijking van de waarde van  $K_F$  (adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich) voor verschillende stoffen alleen mogelijk is als deze  $K_F$ -waarden in dezelfde eenheden worden uitgedrukt (83).

#### 1.9.4.2 Desorptiekinetiek

Dit experiment is bedoeld om na te gaan of een chemische stof reversibel of irreversibel aan de bodem wordt geadsorbeerd. Deze informatie is belangrijk, aangezien het desorptieproces ook bij het gedrag van een stof in de praktijksituatie een belangrijke rol speelt. Bovendien kunnen desorptiegegevens goed worden gebruikt bij computermodellen voor uitloging en de simulering van de afspoeling van opgeloste stoffen. Als een desorptie-onderzoek gewenst wordt, wordt aanbevolen de hier beschreven methode te volgen voor elk systeem waarvoor een nauwkeurige bepaling van  $K_d$  bij de reeds beschreven methode ter bepaling van de adsorptiekinetiek mogelijk was.

Net als voor de bepaling van de adsorptiekinetiek zijn er twee mogelijkheden voor de uitvoering van het desorptiekinetiek-experiment : (a) de parallelle methode en (b) de seriële methode. De keuze van de gevolgde methode wordt aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

(a) parallelle methode : voor elk bodemonster waarvoor het desorptie-onderzoek wordt uitgevoerd, wordt per tijdsinterval waarvoor de desorptiekinetiek wordt onderzocht, een mengsel met dezelfde verhouding bodemonster/oplossing bereid. Bij voorkeur dienen dezelfde tijdsintervallen als bij het adsorptiekinetiek-experiment te worden gebruikt; het totale tijdsinterval kan echter waar nodig worden verlengd om te zorgen dat het desorptie-evenwicht zich kan instellen. Voor elk experiment (één bodemonster, één oplossing) wordt één blanco-bepaling uitgevoerd met dezelfde hoeveelheid bodemonster en 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing (zonder teststof) als bij het experiment. Een controlemonster met de teststof in 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing (zonder bodemonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen. Alle mengsels van bodemonster met oplossing worden geschud totdat het adsorptie-evenwicht (zoals bepaald tijdens fase 2) zich instelt. Vervolgens worden de fasen door centrifugeren gescheiden en wordt de waterfase zo volledig mogelijk verwijderd. De verwijderde oplossing wordt vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing zonder teststof en het nieuwe mengsel wordt opnieuw geschud. De waterfase van de eerste buis wordt na bijvoorbeeld 2 uur zo volledig mogelijk verwijderd en gemeten, van de tweede buis na 4 uur, van de derde buis na 6 uur enz., totdat het desorptie-evenwicht wordt bereikt.

(b) seriële methode : na het adsorptiekinetiek-experiment wordt het mengsel gecentrifugeerd en wordt de waterfase zo volledig mogelijk verwijderd. De verwijderde oplossing wordt vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing zonder teststof. Het nieuwe mengsel wordt geschud totdat het desorptie-evenwicht zich heeft ingesteld. Tijdens deze periode wordt het mengsel op vooraf bepaalde tijdstippen gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. In een kleine hoeveelheid van de waterfase wordt de teststof onmiddellijk geanalyseerd; vervolgens gaat het experiment verder met het oorspronkelijke mengsel. Het volume van elk monster voor de analyse mag niet groter zijn dan 1 % van het totale volume. Om te zorgen dat de verhouding bodemonster/oplossing niet verandert wordt het mengsel aangevuld met hetzelfde volume verse 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing en vervolgens wordt het schudden hervat tot het volgende analysetijdstip.

Het desorptiepercentage wordt op elk tijdstip ( $D_{ti}$ ) en/of over elk tijdsinterval ( $D_{\Delta ti}$ ) berekend (al naar behoefte) en tegen de tijd uitgezet. Tevens wordt de desorptiecoëfficiënt  $K_{des}$  bij evenwicht berekend. Alle benodigde vergelijkingen zijn vermeld in het hoofdstuk Gegevens en rapportage en aanhangsel 5.

Resultaten van het desorptiekinetiek-experiment

Door het desorptiepercentage  $D_{ti}$  en het adsorptiepercentage  $A_{ti}$  in één figuur tegen de tijd uit te zetten kan de omkeerbaarheid van het adsorptieproces worden bepaald. Als het desorptie-evenwicht zich binnen uiterlijk twee maal de equilibratietijd voor de adsorptie instelt en in totaal meer dan 75 % van de geadsorbeerde hoeveelheid wordt gedesorbeerd, wordt de adsorptie als reversibel beschouwd.

#### 1.9.4.3. Desorptie-isothermen

Desorptie-isothermen volgens Freundlich worden bepaald voor de bodemonsters waarvoor ook de adsorptie-isothermen zijn bepaald. De uitvoering van het experiment gebeurt net als bij de bepaling van de desorptiekinetiek met als enige verschil dat de waterfase slechts éénmaal, bij het desorptie-evenwicht, wordt geanalyseerd. De gedesorbeerde hoeveelheid teststof wordt berekend. De hoeveelheid teststof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonster geadsorbeerd blijft, wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof in de oplossing (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage en aanhangsel 5).



## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

De analysegegevens worden in de vorm van tabellen weergegeven (zie aanhangsel 6). De afzonderlijke metingen en de berekende gemiddelden worden vermeld. De adsorptie-isothermen worden grafisch weergegeven. De berekeningen worden volgens onderstaande voorschriften uitgevoerd.

In dit verband wordt ervan uitgegaan dat 1 cm<sup>3</sup> waterige oplossing 1 g weegt. De verhouding bodemonster/oplossing kan in eenheden g/g of g/vol met hetzelfde getal worden weergegeven.

### 2.1 ADSORPTIE

De adsorptie ( $A_t$ ) wordt gedefinieerd als het percentage van de aan het begin van de test aanwezige stof dat onder de testomstandigheden aan het bodemonster wordt geadsorbeerd. Als de teststof stabiel is en niet in significante mate aan de wanden van het vat wordt geadsorbeerd, wordt  $A_t$  op elk tijdstip  $t_i$  als volgt berekend:

$$A_t = \frac{m_i^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

Hierbij is:

$A_t$  = adsorptiepercentage op het tijdstip  $t_i$  (%);

$m_i^{ads}(t_i)$  = massa van de op het tijdstip  $t_i$  aan het bodemonster geadsorbeerde teststof ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de test ( $\mu\text{g}$ ).

Aanhangsel 5 bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop het adsorptiepercentage  $A_t$  voor de parallelle en seriële methode wordt berekend.

De verdelingscoëfficiënt  $K_d$  is de verhouding tussen het gehalte van de bodemfase aan de stof en de massaconcentratie van de stof in de waterige oplossing onder de testomstandigheden nadat het adsorptie-evenwicht is bereikt.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq) \cdot V_0}{m_{aq}^{ads}(eq) \cdot m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

Hierbij is:

$C_s^{ads}(eq)$  = gehalte aan de geadsorbeerde stof in het bodemonster bij het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

$C_{aq}^{ads}(eq)$  = massaconcentratie van de stof in de waterfase bij adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ). Deze concentratie wordt door analyse bepaald, waarbij rekening wordt gehouden met het resultaat van de blanco-bepaling;

$m_s^{ads}(eq)$  = bij adsorptie-evenwicht aan het bodemonster geadsorbeerde massa teststof ( $\mu\text{g}$ )

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = massa van de stof in de oplossing bij adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$m_{soil}$  = hoeveelheid van het bodemonster, uitgedrukt in droge massa (g);

$V_0$  = volume van de waterfase die aan het begin van de test in contact met het bodemonster is (cm<sup>3</sup>).

Het verband tussen  $A_{eq}$  en  $K_d$  is:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (5)$$

Hierbij is:

$A_{eq}$  = adsorptiepercentage bij adsorptie-evenwicht in %.

De genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof  $K_{oc}$  geeft het verband aan tussen de verdelingscoëfficiënt  $K_d$  en het gehalte van het bodemmonster aan organische koolstof:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

Hierbij is:

% oc = percentage organische koolstof in het bodemmonster ( $\text{g g}^{-1}$ ).

$K_{oc}$  is een coëfficiënt die vooral kenmerkend is voor de verdeling van apolaire organische stoffen over de organische koolstof in de bodem of het sediment en water. De adsorptie van deze stoffen is gecorreleerd aan het gehalte van de sorberende vaste stof aan organisch materiaal (?);  $K_{oc}$  is derhalve afhankelijk van de specifieke kenmerken van de humusfracties die door verschillen in onder andere herkomst en ontstaanswijze aanzienlijke verschillen in sorptiecapaciteit vertonen.

### 2.1.1. Adsorptie-isothermen

De vergelijking voor de adsorptie-isothermen volgens Freundlich geeft het verband aan tussen de geadsorbeerde hoeveelheid teststof en de concentratie van de teststof in oplossing bij evenwicht (vergelijking 8).

De gegevens worden behandeld als onder „Adsorptie” en voor elke proefbuis wordt het gehalte aan de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof na de adsorptietest  $C_s^{ads}(eq)$ , elders aangegeven als  $x/m$  berekend. Aangenomen wordt dat het evenwicht zich heeft ingesteld en dat  $C_{aq}^{ads}(eq)$  de waarde bij evenwicht vertegenwoordigt:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (7)$$

De adsorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

of in de lineaire vorm:

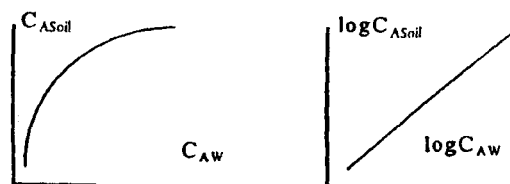
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

Hierbij is:

$K_F^{ads}$  = de adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich; de dimensie is uitsluitend  $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$  als  $1/n = 1$ ; in alle andere gevallen wordt de helling  $1/n$  geïntroduceerd in de dimensie van  $K_F^{ads}$  ( $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$ );

$n$  = de regressieconstante;  $1/n$  ligt meestal tussen 0,7 en 1,0 hetgeen aangeeft dat de sorptiegegevens vaak enigszins niet-lineair zijn.

De vergelijkingen 8 en 9 worden uitgezet en de waarden van  $K_F^{ads}$  en  $1/n$  worden berekend door regressie-analyse met behulp van vergelijking 9. De correlatiecoëfficiënt  $r^2$  van de log-vergelijking wordt ook berekend. Figuur 2 bevat een voorbeeld van dergelijke curves.



Figuur 2: Freundlich-adsorptiecurves, normaal en lineair.

### 2.1.2. Massabalans

De massabalans (MB) wordt gedefinieerd als het percentage van een stof dat na een adsorptietest door analyse wordt teruggevonden in vergelijking met de nominale hoeveelheid stof aan het begin van de test.

De behandeling van de gegevens verschilt voor oplosmiddelen die al dan niet volledig mengbaar zijn met water. Voor met water mengbare oplosmiddelen kan de onder „Desorptie” beschreven behandeling van de gegevens worden gebruikt om de door oplosmidelextractie teruggevonden hoeveelheid stof te bepalen. Als het oplosmiddel minder goed mengbaar is met water, moet de teruggevonden hoeveelheid apart worden bepaald.

De massabalans MB voor de adsorptie wordt als volgt berekend (aangenomen wordt dat de term ( $m_E$ ) overeenkomt met de totale hoeveelheid teststof die met een organisch oplosmiddel uit het bodemonmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd):

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

Hierbij is:

MB = massabalans (%);

$m_E$  = totale hoeveelheid teststof die in twee stappen uit het bodemonmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemonmonster op het tijdstip  $t = 0$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

$V_{rec}$  = volume van het supernatans dat na het adsorptie-evenwicht wordt verwijderd ( $\text{cm}^{-3}$ ).

### 2.2. DESORPTIE

De desorptie (D) wordt gedefinieerd als het percentage van de teststof dat onder de testomstandigheden wordt gedesorbeerd in vergelijking met de hoeveelheid stof die daarvoor was geadsorbeerd:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

Hierbij is:

$D_{t_i}$  = desorptiepercentage op het tijdstip  $t_i$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = massa van de uit het bodemonmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_s^{des}(eq)$  = massa van de bij adsorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerde teststof ( $\mu\text{g}$ ).

Aanhangsel 5 bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop het desorptiepercentage  $D_{t_i}$  voor de parallele en de seriële methode wordt berekend.

De schijnbare desorptiecoëfficiënt ( $K_{des}$ ) is de verhouding tussen het resterende gehalte van de bodemfase aan de stof en de massaconcentratie van de gedesorbeerde stof in de waterige oplossing onder de testomstandigheden nadat het desorptie-evenwicht is bereikt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

Hierbij is:

$K_{des}$  = desorptiecoëfficiënt ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ );

$m_{aq}^{des}(eq)$  = totale massa van de bij desorptie-evenwicht uit het bodemonmonster gedesorbeerde teststof ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = totaalvolume van de waterfase die tijdens de desorptiekinetiektest in contact met het bodemonmonster is ( $\text{cm}^3$ ).

In aanhangsel 5 worden in het hoofdstuk „Desorptie” richtsnoeren gegeven voor de berekening van  $m_{aq}^{des}(eq)$ .

**Opmerking**

Als de adsorptietest volgens de parallelle methode werd uitgevoerd, wordt het volume  $V_T$  in vergelijking 12 gelijkgesteld aan  $V_0$ .

**2.2.1. Desorptie-isothermen**

De vergelijking voor de desorptie-isothermen volgens Freundlich geeft het verband aan tussen de hoeveelheid teststof die aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft en de concentratie van de teststof in oplossing bij het desorptie-evenwicht (vergelijking 16).

Voor elke proefbuis wordt de hoeveelheid teststof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft, als volgt berekend:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$  wordt gedefinieerd als:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_T^f} - m_{aq}^A (\mu\text{g}) \quad (14)$$

Hierbij is:

$C_s^{des}(eq)$  = gehalte aan de teststof dat bij het desorptie-evenwicht aan het bodemonmonster geadsorbeerd blijft ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$m_m^{des}(eq)$  = analytisch bepaalde massa van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^A$  = massa van de stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^{des}(eq)$  = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_T^f$  = volume van de oplossing dat voor de bepaling van de teststof bij het desorptie-evenwicht uit de buis is genomen ( $\text{cm}^3$ );

$V_R$  = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis is verwijderd en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing ( $\text{cm}^3$ );

De desorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

of in de lineaire vorm:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

Hierbij is:

$K_F^{des}$  = de desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich;

$n$  = de regressieconstante;

$C_{aq}^{des}(eq)$  = de massaconcentratie van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ).

De vergelijkingen 16 en 17 kunnen worden uitgezet en en  $K_F^{des}$  en  $1/n$  worden berekend door regressie-analyse met behulp van vergelijking 17.

**Opmerking**

Als de adsorptie- of desorptie-exponent volgens Freundlich ( $1/n$ ) gelijk is aan 1, is de adsorptie- of desorptie-coëfficiënt volgens Freundlich ( $K_F^{ads}$  respectievelijk  $K_F^{des}$ ) gelijk aan de adsorptie- of desorptie-evenwichtsconstante ( $K_d$  respectievelijk  $K_{des}$ ) en is de curve van  $C_s$  tegen  $C_{aq}$  lineair. Als de exponent niet gelijk is aan 1, is de curve van  $C_s$  tegen  $C_{aq}$  niet lineair en varieert de adsorptie- en desorptieconstante over de isotherm.

### 2.2.2 TESTVERSLAG

In het testsverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

- Volledige identificatie van de gebruikte bodemonmonsters met vermelding van :
- geografische gegevens van de locatie (lengte en breedte);
- datum van monsterneming;
- gebruikspatroon (landbouw, bosbouw,...);
- diepte van monsterneming;
- zand/silt/klei-gehalte;
- pH-waarden (in 0,01 M CaCl<sub>2</sub>);
- gehalte aan organische koolstof;
- gehalte aan organisch materiaal;
- stikstofgehalte;
- C/N-verhouding;
- kationuitwisselingscapaciteit (mmol/kg);
- alle informatie over het verzamelen en de opslag van bodemonmonsters;
- indien van toepassing, alle relevante informatie voor de interpretatie van de adsorptie/desorptie van de teststof;
- referentie van de methoden die voor de bepaling van de verschillende parameters zijn gebruikt;
- informatie over de teststof, indien van toepassing;
- temperatuur van de experimenten;
- omstandigheden bij het centrifugeren;
- analysemethode die voor de bepaling van de teststof is gebruikt;
- motivering voor een eventueel gebruik van een solubilisator bij de bereiding van de stockoplossing van de teststof;
- verklaring voor correcties bij de berekeningen, indien van toepassing;
- gegevens aan de hand van het formulier daarvoor (aanhangsel 6) en grafische afbeeldingen;
- alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de testresultaten.

### 3. REFERENTIES

- (1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
- (2) Fränze O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
- (3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils : Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
- (5) US-Environment Protection Agency : Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry : Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date : 1/1988.
- (6) US-Environment Protection Agency : Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No : 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No : 712-C-96-048, April 1996.
- (7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K<sub>oc</sub>) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- (8) Agriculture Canada : Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- (9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995) : Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988) : Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- (11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- (12) Calvet R., (1989), « Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils », in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- (13) Calvet R., (1980) « Adsorption-Desorption Phenomena » in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
- (14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), « The sorption of nonpolar organics by soils and sediments » in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
- (15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), « An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media ». Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.
- (16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), « Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis », in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- (17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), « Movement and sorption of chemicals applied to the soil ». Weeds, 13, pp. 185-190.
- (18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) « Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils ». J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.
- (19) Russell M.H., (1995), « Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil » in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- (20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), « Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides », IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.



- (21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), « Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils ». Proc. BCPC Symposium : Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
- (22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), « Persistence of herbicides in soil ». J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.
- (23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), « Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption ». Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.
- (24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). « Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides ». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.
- (25) Osgerby J.M., (1973), « Process affecting herbicide action in soil ». Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.
- (26) Guth J.A., (1972), « Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden ». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.
- (27) Hamaker J.W., (1975), « The interpretation of soil leaching experiments », in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
- (28) Helling C.S., (1971), « Pesticide mobility in soils ». Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.
- (29) Hamaker J.W., (1972), « Diffusion and volatilization » in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.
- (30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), « Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system ». Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.
- (31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), « Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses », in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (32) Gustafson D.I., (1989), « Groundwater ubiquity score : a simple method for assessing pesticide leachability ». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.
- (33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). « Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils ». J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.
- (34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), « Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils ». Pest. Sci., 11, pp. 389-395.
- (35) Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), « Sorption estimates for modeling », in Pesticides in the Soil Environment : Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
- (36) Lambert S.M., (1967), « Functional relationship between sorption in soil and chemical structure ». J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.
- (37) Hance R.J., (1969), « An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils ». J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.
- (38) Briggs G.G. (1969), « Molecular structure of herbicides and their sorption by soils ». Nature, 223, 1288.
- (39) Briggs G.G. (1981). « Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor ». J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.
- (40) Sabljic A., (1984), « Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology ». J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.
- (41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), « Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil ». Residue Rev., 32, pp. 29-92.
- (42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), « Adsorption of organic herbicides by montomorillonite : Role of pH and chemical character of adsorbate ». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32 : pp. 222-234.
- (43) Karickhoff S.W., (1981) « Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils ». Chemosphere 10, pp. 833-846.
- (44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), « Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners ». Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.
- (45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). « Adsorption in organic chemicals » in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
- (46) Deli J., and Warren G.F., 1971, « Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils ». Weed Sci. 19 : pp. 67-69.
- (47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), « Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils ». Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.
- (48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) « Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations » in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
- (49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), « Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase », CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III : Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- (50) ISO Standard Compendium Environment : Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- (51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- (52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. « Methods of Soil Analysis », Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
- (53) ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1 : Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2 : Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3 : Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4 : Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5 : Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- (58) ISO 10381-6, 1993 : Soil Quality - Sampling - Part 6 : Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) « Precision in pesticide adsorption measurements ». Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.
- (60) Grover R., and Hance R.J. (1970), « Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine ». Soil Sci., pp. 109-138.

- (61) Boesten, J.J.T.I., « Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system ». *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31-41.
- (62) Boesten, J.J.T.I. « Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106 » Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.
- (63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), « Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique ». *Weed Res.* 21, pp. 227-231.
- (64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), « Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments ». *J. Environ.Qual.*, 10(3), pp. 382-386.
- (65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), « Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water ». *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), pp. 227-231.
- (66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), « Sorption of organic substances by soils and sediments ». *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 297-312.
- (67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), « Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons ». *Chemosphere*, 16(1), pp. 109-116.
- (68) Lyman W.J., Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds.* American Chemical Society, Washington DC.
- (69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). « Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota » in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
- (70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), « A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds ». *Science*, Vol. 206, pp. 831-832.
- (71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), « Sorption of *p*-Naphthol : implications concerning the limits of hydrophobic sorption ». *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, pp. 38-42.
- (72) Karickhoff S.W., (1981), « Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils ». *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833-846.
- (73) Moreale A., van Bladel R., (1981), « Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319-322.
- (74) Müller M., Kördel W. (1996), « Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil ». *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493-2504.
- (75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), « HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test ». *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373-1384.
- (76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), « HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), pp. 2341-2352.
- (77) Hance, R.J., (1967), « The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides ». *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
- (78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), « The retention processes : mechanisms » in *Pesticides in the Soil Environment : Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- (79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), « Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses », in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (80) Giles C.H., (1970), « Interpretation and use of sorption isotherms » in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.
- (81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), « Studies in adsorption : XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils ». *J. Chem. Soc.*, pp. 3973-93.
- (82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), « Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants : 3. Caractéristiques générales de l'adsorption ». *Ann. Agron.* 31 : pp. 239-251.
- (83) Bedbur E., (1996), « Anomalies in the Freundlich equation », *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
- (84) Guth, J.A., (1985), « Adsorption/desorption », in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
- (85) Soil Texture Classification (US and FAO systems) : *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26 :305 (1962).

Nota's

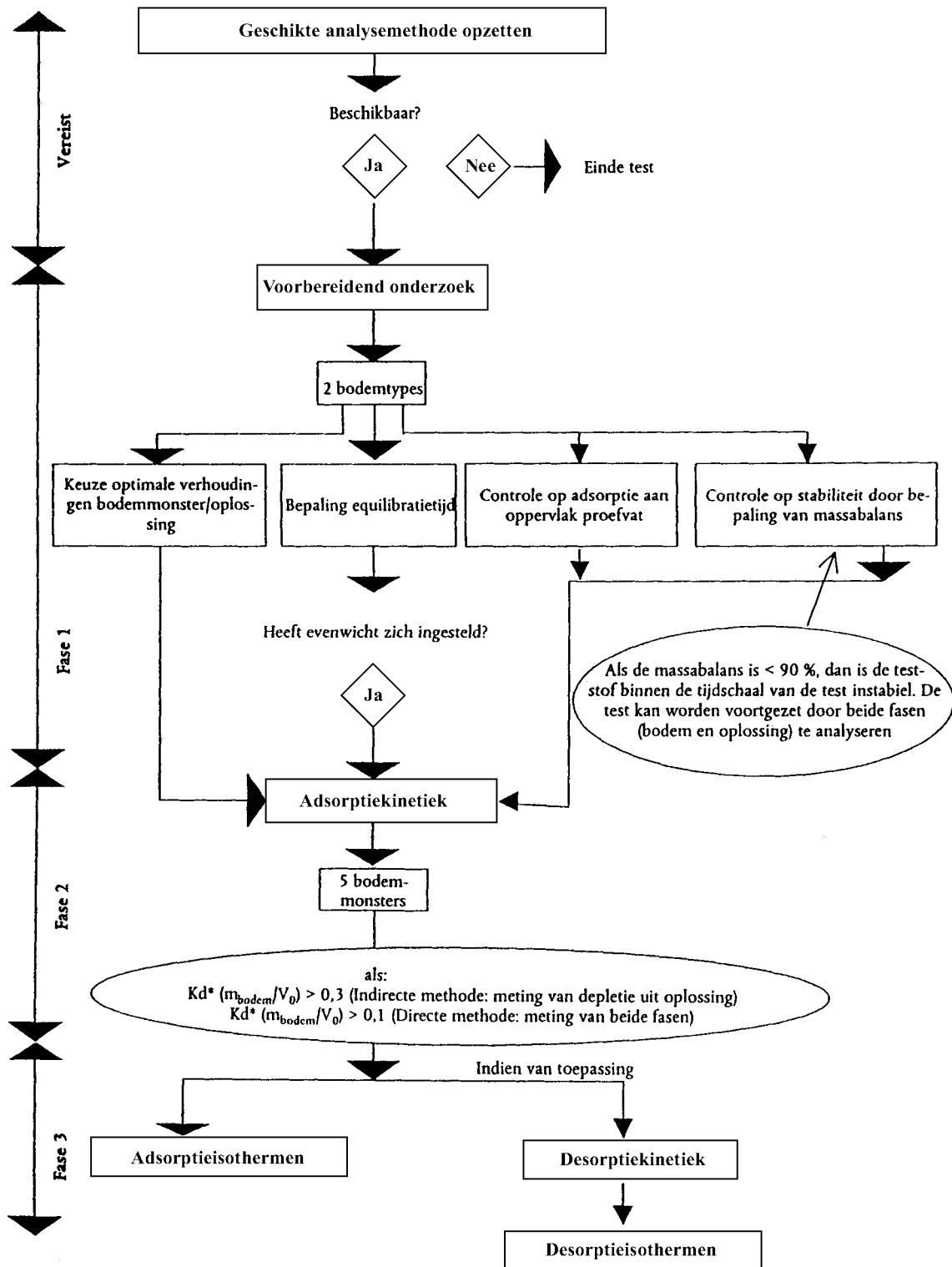
$$C_r^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$$

(<sup>2</sup>) Curves waarin de concentratie van de teststof in de waterfase  $C_{aq}^{ads}$  wordt uitgezet tegen de tijd, kunnen ook worden gebruikt om te bepalen wanneer het evenwicht wordt bereikt (zie figuur 2 in aanhangsel 5).

(<sup>3</sup>) DT-50: tijd waarin 50 % van de teststof wordt afgebroken.

## AANHANGSEL 1

## TESTSCHEMA



AANHANGSEL 2

**INVLOED VAN DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ANALYSEMETHODE EN DE CONCENTRATIEVERANDERING OP DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ADSORPTIERESULTATEN**

Uit onderstaande tabel (84) blijkt duidelijk dat wanneer het verschil tussen de aanvankelijke massa ( $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ) en de evenwichtsmassa  $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$  van de teststof in de oplossing heel klein is, een fout van 5 % in de meting van de evenwichtconcentratie leidt tot een fout van 50 % bij de berekening van het gehalte aan de stof dat aan het bodemonster is geadsorbeerd ( $m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ) en van 52,4 % bij de berekening van  $K_d$ .

Hoeveelheid bodemonster:  $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$   
 Volume van de oplossing:  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	R	$(m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}))^*$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$R^{\dagger}$	$K_d^*$	$R^{\dagger}$
<b>VOOR A = 9 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ of $C_0 = 1.100 \mu\text{g/cm}^3$	100	1,000	Ware waarde	10	1,00	Ware waarde	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
<b>VOOR A = 55 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ of $C_0 = 1.100 \mu\text{g/cm}^3$	50,0	0,500	Ware waarde	60,0	6,00	Ware waarde	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
<b>VOOR A = 99 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ of $C_0 = 1.100 \mu\text{g/cm}^3$	1,100	0,011	Ware waarde	108,9	10,89	Ware waarde	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

waarin:

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{bodem}}}, K_d = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{bodem}}}$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = massa van de teststof in de bodemfase bij evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = massa van de teststof in de waterfase bij evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = gehalte van de bodemfase aan de teststof bij evenwicht ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = massaconcentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )

R = analysefout in de bepaling van  $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

$R^{\dagger}$  = fout in berekening ten gevolge van de analysefout R.

## AANHANGSEL 3

SCHATTINGSTECHNIEKEN VOOR  $K_d$ 

1. Schattingstechnieken maken een prognose van  $K_d$  mogelijk op basis van een correlatie met bijvoorbeeld  $P_{ow}$ -waarden (12) (39) (63-68), gegevens over de oplosbaarheid in water (12) (19) (21) (39) (68-73), of polariteitsgegevens die door HPLC bij omgekeerde fase zijn verkregen (74-76).  $K_{oc}$  of  $K_{om}$  wordt berekend met behulp van de vergelijkingen in de tabellen 1 en 2 en vervolgens wordt  $K_d$  berekend uit de vergelijkingen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Deze correlaties zijn gebaseerd op twee uitgangspunten: (1.) de adsorptie van een stof wordt vooral bepaald door het organisch materiaal in de bodem en (2.) de interacties daarbij zijn voornamelijk niet-polair. Dit betekent dat deze correlaties: (1.) niet of slechts tot op zekere hoogte gelden voor polaire stoffen en (2.) niet kunnen worden gebruikt wanneer het gehalte van de bodem aan organisch materiaal zeer laag is (12). Bovendien is de correlatie tussen  $P_{ow}$  en de adsorptie wel bevredigend gebleken (19), maar kan dit niet worden gezegd voor het verband tussen de oplosbaarheid in water en de adsorptie (19) (21); tot op heden zijn de resultaten van de studies zeer tegenstrijdig.
3. In de tabellen 1 en 2 worden enkele voorbeelden gegeven van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en respectievelijk de verdelingscoëfficiënt octanol/water en de oplosbaarheid in water.

Tabel 1. Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de verdelingscoëfficiënt octanol/water; zie voor andere voorbeelden (12) en (68)

Stoffen	Correlaties	Auteurs
Gesubstitueerde ureumverbindingen	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Gechlordeerde aromaten	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou et al (1983) (65)
Uiteenlopende pesticiden	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl en Mingelgrin (1984) (66)
Aromatische koolwaterstoffen	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles en Mantoura (1987) (67)

Tabel 2. Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de oplosbaarheid in water; zie voor andere voorbeelden (68) en (69).

Verbindingen	Correlaties	Auteurs
Uiteenlopende pesticiden	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl en Mingelgrin (1984) (66)
Gechlordeerde alifaten en aromaten	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
$\alpha$ -Naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cyclische alifaten en aromaten	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 \text{ (mp-25)}$	Karickhoff (1981) (72)
Uiteenlopende stoffen	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)



## AANHANGSEL 4

## BEREKENINGEN VOOR DE BEPALING VAN DE CENTRIFUGEEROMSTANDIGHEDEN

1. Voor de centrifugeertijd geldt, uitgaande van ronde deeltjes, de volgende formule:

$$t = \frac{9}{2} \left[ \frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Ter vereenvoudiging worden alle parameters in niet-SI-eenheden (g, cm) beschreven.

Hierbij is:

$\omega$  = rotatiesnelheid (=  $2 \pi \text{ rpm}/60$ ) in  $\text{rad s}^{-1}$

rpm = aantal omwentelingen per minuut

$\eta$  = viscositeit van de oplossing in  $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$r_p$  = straal van de deeltjes in cm

$\rho_s$  = dichtheid van het bodemmonster in  $\text{g cm}^{-3}$

$\rho_{aq}$  = dichtheid van de oplossing in  $\text{g cm}^{-3}$

$R_t$  = afstand tussen het middelpunt van de centrifugerotor en het vloeistofoppervlak in de centrifugebuis in cm

$R_b$  = afstand tussen het middelpunt van de centrifugerotor en de bodem van de centrifugebuis in cm

$R_b - R_t$  = hoogte van het mengsel bodemmonster/oplossing in de centrifugebuis in cm.

Om een volledige scheiding te waarborgen moet in het algemeen het dubbele van de berekende tijd worden gebruikt.

2. Vergelijking (1) kan verder worden vereenvoudigd als we ervan uitgaan dat de viscositeit ( $\eta$ ) en de dichtheid ( $\rho_{aq}$ ) van de oplossing gelijk zijn aan de viscositeit en de dichtheid van water bij 25 °C, d.w.z.  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en  $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

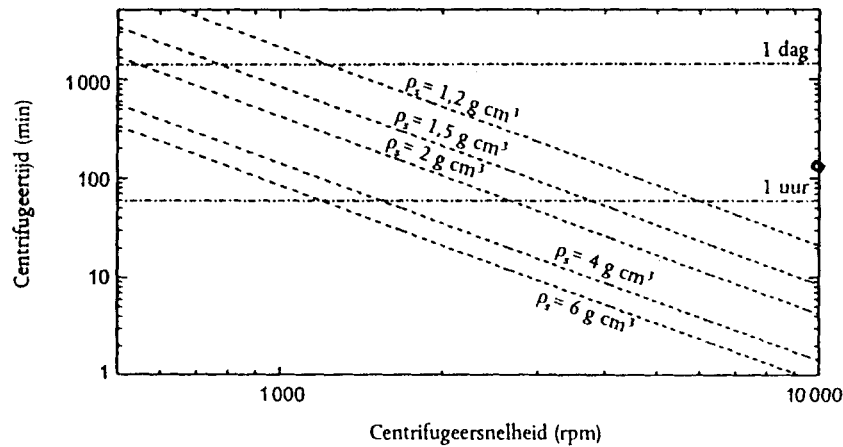
In dat geval geldt voor de centrifugeertijd:

$$t = \frac{3,7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

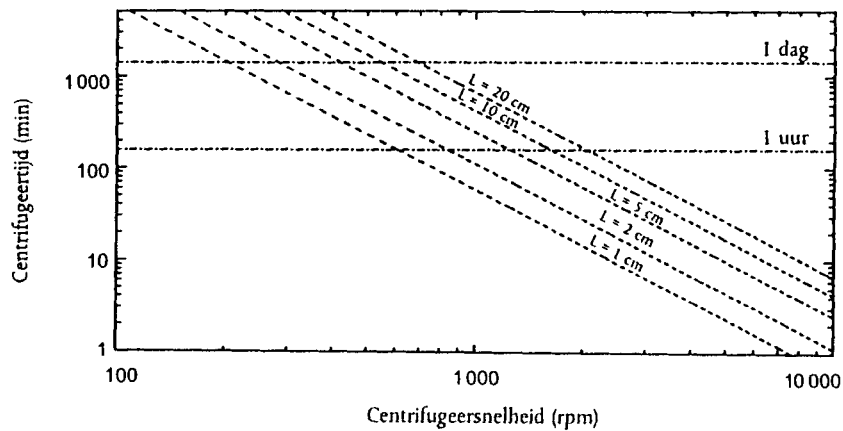
3. Uit vergelijking (2) blijkt dat voor een scheiding van deeltjes met een specifieke grootte (in ons geval een straal van 0,1  $\mu\text{m}$ ) twee parameters belangrijk zijn bij de bepaling van de centrifugeeromstandigheden (tijd en snelheid): 1. de dichtheid van het bodemmonster en 2. de hoogte van het mengsel in de centrifugebuis ( $R_b - R_t$ ), d.w.z. de afstand die een bodemdeeltje van het vloeistofoppervlak van de oplossing naar de bodem van de buis moet afleggen; bij een vast volume wordt de hoogte van het mengsel in de buis uiteraard bepaald door het kwadraat van de straal van de buis.
4. Figuur 1 geeft het verband tussen centrifugeertijd ( $t$ ) en -snelheid (rpm) bij uiteenlopende bodemdichtheid ( $\rho_s$ ) (figuur 1a) en uiteenlopende hoogte van het mengsel in de centrifugebuis (figuur 1b). Uit figuur 1a blijkt duidelijk wat de invloed van de bodemdichtheid is: bij een gangbare centrifugeersnelheid van 3 000 rpm is de centrifugeertijd ongeveer 240 minuten bij een bodemdichtheid van 1,2  $\text{g cm}^{-3}$  en slechts 50 minuten bij 2,0  $\text{g cm}^{-3}$ . Figuur 1b levert voor een gangbare centrifugeersnelheid van 3 000 rpm ongeveer 50 minuten op bij een hoogte van het mengsel van 10 cm en slechts zeven minuten bij een hoogte van 1 cm. Het is echter belangrijk dat er een optimaal compromis wordt gevonden tussen zo kort mogelijk centrifugerende en optimaal gebruiksgemak bij de scheiding van de fasen na het centrifugeren.

5. Bovendien moet bij de bepaling van de experimentele omstandigheden bij het scheiden van bodemfase en oplossing worden bedacht dat er een derde „pseudofase“ kan ontstaan: colloïden. Deze deeltjes met een grootte van minder dan  $0,2 \mu\text{m}$  kunnen een belangrijke rol spelen bij het hele adsorptiemechanisme van een stof in een bodemsuspensie. Wanneer wordt gecentrifugeerd zoals hierboven is beschreven, blijven de colloïden in de waterfase en worden ze tegelijk met de waterfase geanalyseerd. Dit betekent dat de informatie over het effect van deze deeltjes verloren gaat.

Als het laboratorium beschikt over ultracentrifuges of ultrafiltratiefaciliteiten, kan de adsorptie/desorptie van een stof in de bodem diepgaander worden onderzocht en kan ook informatie worden verkregen over de adsorptie van de stof aan colloïden. In dit geval moet ultracentrifugatie bij 60 000 rpm of ultrafiltratie met een porositeit van 100 000 Dalton worden gebruikt voor een scheiding van de drie fasen bodem, colloïden en oplossing. Het testprotocol moet ook dienovereenkomstig worden gewijzigd, zodat de analyse van de stof bij alle drie fasen wordt uitgevoerd.



Figuur 1a: Verband tussen centrifugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende bodemdichtheid ( $\rho_s$ ).  
 $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en  $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  bij  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

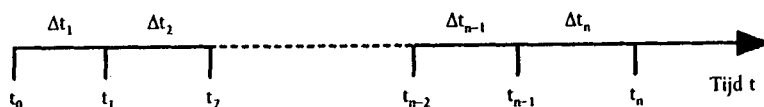


Figuur 1b: Verband tussen centrifugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende hoogte van het mengsel in de centrifugebuis ( $R_b - R_t$ ) = L;  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  bij  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en  $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

## AANHANGSEL 5

## BEREKENING VAN DE ADSORPTIE A (%) EN DESORPTIE D (%)

Het tijdschema voor de procedure is:



Voor alle berekeningen wordt ervan uitgegaan dat de teststof stabiel is en niet in significante mate aan de wanden van het proefvat wordt geadsorbeerd.

### ADSORPTIE A (%)

#### a) Parallele methode

Het adsorptiepercentage wordt voor elke proefbuis (i) op elk tijdstip  $t_i$  berekend volgens de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{m_i^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1) \text{ (1)}$$

De factoren in deze vergelijking worden als volgt berekend:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_i^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

Hierbij is:

$A_{t_i}$  = adsorptiepercentage (%) op het tijdstip  $t_i$

$m_i^{\text{ads}}(t_i)$  = massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof op het tijdstip  $t_i$  waarop de analyse wordt uitgevoerd ( $\mu\text{g}$ )

$m_0$  = massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de test ( $\mu\text{g}$ )

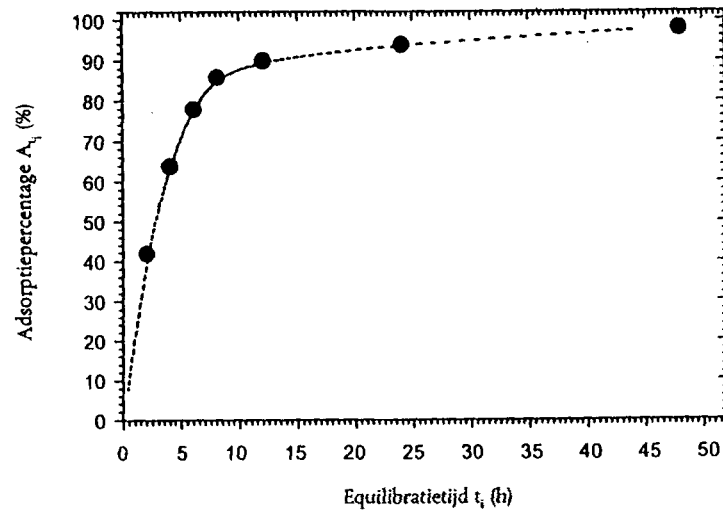
$C_0$  = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip  $t = 0$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  = massaconcentratie van de stof in de waterfase op het tijdstip  $t_i$  waarop de analyse wordt uitgevoerd ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ); deze concentratie wordt door analyse bepaald, rekening houdend met de resultaten van de blancobepaling

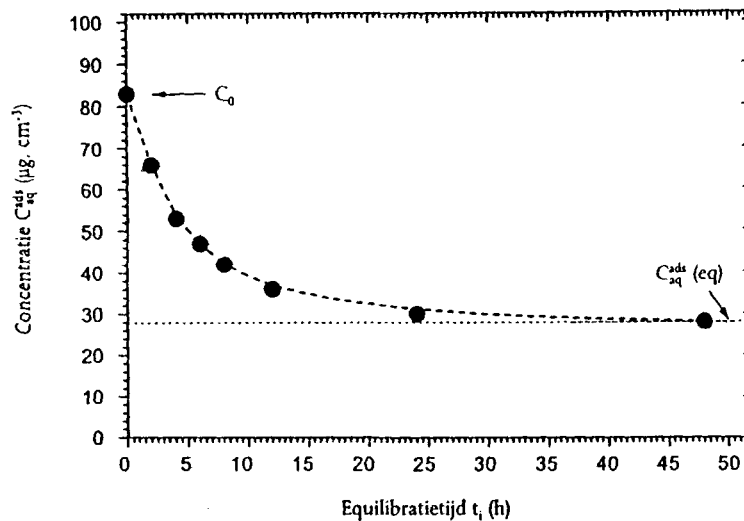
$V_0$  = volume van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip  $t = 0$  ( $\text{cm}^3$ ).

Het adsorptiepercentage  $A_{t_i}$  of  $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het sorptie-evenwicht zich heeft ingesteld; de figuren 1 en 2 bevatten voorbeelden van dergelijke curves.

(1) Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.



Figuur 1: Adsorptie-evenwichtcurve



Figuur 2: Massaconcentratie van de teststof in de waterfase ( $C_{wq}$ ) uitgezet tegen de tijd

b) *Seriële methode*

In de volgende vergelijkingen wordt er rekening mee gehouden dat de adsorptieprocedure wordt uitgevoerd door meting van de teststof in kleine porties van de waterfase na specifieke tijdsintervallen.

— De hoeveelheid van de stof die gedurende elk tijdsinterval aan het bodemonmonster wordt geadsorbeerd, wordt als volgt berekend:

— voor het eerste tijdsinterval  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_s^A}\right) \quad (4)$$

— voor het tweede tijdsinterval  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_s^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_s^A}{V_s^A}\right) \quad (5)$$

— voor het derde tijdsinterval  $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_2^A}{v_2^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot v_2^A}{v_2^A} \right) \quad (6)$$

— voor het  $n^e$  tijdsinterval  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_2^A}{v_2^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-1) \cdot v_2^A}{v_2^A} \right) \quad (7)$$

— Het adsorptiepercentage over elk tijdsinterval ( $A_{\Delta t_i}$ ) wordt berekend met behulp van de volgende vergelijking:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8) \quad (1)$$

terwijl het adsorptiepercentage op het tijdstip  $t_i$  ( $A_{t_i}$ ) wordt berekend met de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9) \quad (1)$$

Het adsorptiepercentage  $A_{t_i}$  of  $A_{\Delta t_i}$  (afhankelijk van de eisen van de studie) wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het sorptie-evenwicht zich heeft ingesteld.

— Op het evenwichtstijdstip  $t_{eq}$ :

— is de massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10) \quad (1)$$

— is de massa van de teststof in de oplossing:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11) \quad (1)$$

— en is het adsorptiepercentage bij evenwicht:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12) \quad (1)$$

De hier gebruikte parameters worden gedefinieerd als:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$  = massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof gedurende de tijdsintervallen  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$  = massa van de stof, gemeten in een monster op het tijdstip  $v_2^A$  op het tijdstip  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_s^{ads}(eq)$  = massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof bij het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$v_2^A$  = volume van het monster waarin de teststof wordt bepaald ( $\text{cm}^3$ )

$A_{\Delta t_i}$  = adsorptiepercentage dat overeenkomt met een tijdsinterval  $\Delta t_i$  (%)

$A_{eq}$  = adsorptiepercentage bij het adsorptie-evenwicht (%).

(1) Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.



## DESORPTIE D (%)

Als het tijdstip  $t_0$  waarop het desorptie-experiment begint, wordt het moment beschouwd waarop het maximale volume van de oplossing met teststof (nadat het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld) wordt verwijderd en vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing.

a) *Parallele methode*

Op een tijdstip  $t_i$  wordt de massa van de teststof gemeten in de waterfase die uit buis  $i$  is verwijderd ( $V_r^i$ ) en wordt de gedesorbeerde massa berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{\text{aq}}^{\Lambda} \quad (13)$$

Bij het desorptie-evenwicht is  $t_i = t_{\text{eq}}$  en derhalve  $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ .

De massa van de gedurende een tijdsinterval ( $\Delta t_i$ ) gedesorbeerde teststof is:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Het desorptiepercentage wordt berekend:

— op een tijdstip  $t_i$  met de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (15)$$

— en gedurende een tijdsinterval ( $\Delta t_i$ ) met de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (16)$$

Hierbij is:

$D_{t_i}$  = desorptiepercentage op een tijdstip  $t_i$  (%)

$D_{\Delta t_i}$  = desorptiepercentage over een tijdsinterval  $\Delta t_i$  (%)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$  = massa van de op een tijdstip  $t_i$  gedesorbeerde teststof ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$  = massa van de gedurende een tijdsinterval  $\Delta t_i$  gedesorbeerde teststof ( $\mu\text{g}$ )

$m_m^{\text{des}}(t_i)$  = analytisch bepaalde massa van de teststof in een op een tijdstip  $t_i$  voor analyse genomen volume-oplossing  $V_r^i$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\Lambda}$  = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ ).

$$m_{\text{aq}}^{\Lambda} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = massa van de teststof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$V_R$  = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing ( $\text{cm}^3$ )

$V_r^i$  = volume van de oplossing die bij het desorptiekinetiek-experiment voor de bepaling van de teststof uit buis ( $i$ ) is genomen ( $\text{cm}^3$ ).

Het desorptiepercentage  $D_i$  of  $D_{\Delta t_i}$  (afhankelijk van de eisen van de studie) wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het desorptie-evenwicht zich heeft ingesteld.

b) *Seriële methode*

In de volgende vergelijkingen wordt er rekening mee gehouden dat de adsorptieprocedure is uitgevoerd door meting van de teststof in kleine porties ( $v_s^A$ ) van de waterfase (de seriële methode in punt 1.9: „Uitvoering van de test“). Aangenomen wordt dat a) het na het adsorptiekinetiek-experiment uit de buis verwijderde supernatans is vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing ( $V_p$ ) en b) het totale volume van de waterfase in contact met het bodemonmonster ( $V_T$ ) gedurende het desorptiekinetiek-experiment constant blijft en wordt gegeven door de vergelijking:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_s^A(i) \quad (18)$$

Op een tijdstip  $t_i$ :

— De massa van de teststof in een kleine hoeveelheid oplossing ( $v_s^D$ ) wordt bepaald en de gedesorbeerde massa wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left( \frac{V_T}{v_s^D} \right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (i-1) \cdot v_s^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

— Bij het desorptie-evenwicht is  $t_i = t_{\text{eq}}$  en derhalve  $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ .

— Het desorptie-percentages  $D_i$  wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_i = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (20)$$

Over een tijdsinterval ( $\Delta t_i$ ):

Over elk tijdsinterval wordt de hoeveelheid gedesorbeerde stof als volgt berekend:

— voor het eerste tijdsinterval  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_m^{\text{des}}(t_1) \cdot \left( \frac{V_T}{v_s^D} \right) - m_{\text{aq}}^A \quad \text{en} \quad m_s^{\text{des}}(t_1) = m_s^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— voor het tweede tijdsinterval  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{des}}(t_2) \cdot \left( \frac{V_T}{v_s^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left( \frac{(V_T - v_s^D)}{V_T} \right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left( \frac{(V_T - v_s^D)}{V_T} \right) \quad \text{en}$$

$$m_s^{\text{des}}(t_2) = m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) - [m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

— voor het  $n^{\text{e}}$  tijdsinterval  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[ m_m^{\text{des}}(t_n) \cdot \left( \frac{V_T}{v_s^D} \right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (n-1) \cdot v_s^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n+1}^{n-1} \left( \frac{(V_T - (n-i) \cdot v_s^D)}{V_T} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right] \quad \text{en}$$

$$m_s^{\text{des}}(t_n) = m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n+1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Ten slotte wordt het desorptiepercentage over elk tijdsinterval  $D_{\Delta t_i}$  berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

terwijl het desorptiepercentage op het tijdstip  $t_i$  ( $D_{t_i}$ ) wordt berekend met de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

De hier gebruikte parameters worden gedefinieerd als:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = massa van de teststof die aan het bodemmonster blijft geadsorbeerd na de tijdsintervallen  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = massa van de teststof die wordt gedesorbeerd gedurende de tijdsintervallen  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1), m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2), \dots, m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n)$  = massa van de teststof die in een hoeveelheid oplossing ( $v_{\text{s}}^{\text{D}}$ ) wordt gemeten op de tijdstippen  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$V_{\text{T}}$  = totaalvolume van de waterfase die tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment in contact met het bodemmonster is ( $\text{cm}^3$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{A}}$  = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht ( $\mu\text{g}$ )

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{s}}^{\text{A}}(i) \right) - V_{\text{R}}}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{s}}^{\text{A}}(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

$V_{\text{R}}$  = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oplossing ( $\text{cm}^3$ )

$v_{\text{s}}^{\text{D}}$  = volume van het monster dat tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment voor analysedoeleinden uit buis (i) wordt genomen ( $\text{cm}^3$ ).

$$v_{\text{s}}^{\text{D}} \leq 0,02 \cdot V_{\text{T}} \quad (27)$$

## AANHANGSEL 6

## ADSORPTIE/DESORPTIE IN DE BODEM: RAPPORTAGEFORMULIEREN

Geteste stof:

Getest bodemonmonster:

Gehalte van het bodemonmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): .....%

Temperatuur: .....°C

## Geschiktheid van de analysemethode

Gewicht bodemonmonster	g	
Droge massa in bodemonmonster	g	
Volume CaCl <sub>2</sub> -oplossing	cm <sup>3</sup>	
Nominale concentratie eindoplossing	µg cm <sup>-3</sup>	
Concentratie eindoplossing bij analyse	µg cm <sup>-3</sup>	

Principe van de gebruikte analysemethode:

Kalibratie van de analysemethode:



Geteste stof:

Getest bodemonster:

Gehalte van het bodemonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

Gevolgde analysemethodologie: Indirect  Parallel  Serieel Direct **Adsorptietest: testmonsters**

	Symbool	Eenheid	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd	Equilibratietijd
Buis nr.						
Gewicht bodemonster	—	g				
Droge massa bodemonster	$m_{\text{bod}}$	g				
Volume water in afgewogen bodemonster (berekend)	$V_{\text{WS}}$	cm <sup>3</sup>				
Volume 0,01 M CaCl <sub>2</sub> -oplossing voor equilibratie bodemonster		cm <sup>3</sup>				
Volume stockoplossing		cm <sup>3</sup>				
Totaal volume waterfase in contact met bodemonster	$V_0$	cm <sup>3</sup>				
Beginconcentratie testoplossing	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>				
Massa teststof aan begin van de test	$m_0$	µg				

**Na schudden en centrifugeren****Indirecte methode****Parallele methode**

Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$	µg cm <sup>-3</sup>					

**Seriële methode**

Gemeten massa teststof in het analysemonster $V_s^A$	$m_m^{\text{ads}}(t_i)$	µg					

**Directe methode**

Massa aan het bodemonster geadsorbeerde teststof	$m_s^{\text{ads}}(t_i)$	µg					

**Berekening van de adsorptie**

Adsorptie	$A_{t_i}$	%					
	$A_{\Delta t_i}$	%					
Gemiddelde							
Adsorptie	$K_d$	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>					
Gemiddelde							
Adsorptie	$K_{\text{oc}}$	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>					
Gemiddelde							

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

**Adsorptietest: blanco- en controlebepalingen**

	Symbol	Eenheid	Blanco		Blanco		Controle	
Buis nr.								
Gewicht bodemmonster		g					0	0
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)		cm <sup>3</sup>					—	—
Toegevoegd volume 0,01 M CaCl <sub>2</sub> -oplossing		cm <sup>3</sup>						
Toegevoegd volume stockoplossing met teststof		cm <sup>3</sup>	0	0				
Totaal volume waterfase (berekend)		cm <sup>3</sup>					—	—
Beginconcentratie van de teststof in de waterfase		µg cm <sup>-3</sup>						

**Na schudden en centrifugeren**

Concentratie in waterfase		µg cm <sup>-3</sup>						
---------------------------	--	---------------------	--	--	--	--	--	--

NB: Indien nodig kolommen toevoegen.

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

**Massabalans**

	Symbol	Eenheid				
Buis nr.						
Gewicht bodemmonster	—	g				
Droge massa bodemmonster	$m_{\text{soil}}$	g				
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	$V_{\text{WS}}$	ml				
Volume 0,01 M CaCl <sub>2</sub> -oplossing voor equilibratie bodemmonster		ml				
Volume stockoplossing		cm <sup>3</sup>				
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster	$V_0$	cm <sup>3</sup>				
Beginconcentratie testoplossing	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>				
Equilibratietijd	—	uur				

**Na schudden en centrifugeren**

Concentratie teststof in waterfase bij adsorptie-evenwicht na correctie blanco	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	µg cm <sup>-3</sup>				
Equilibratietijd	$t_{\text{eq}}$	uur				

**Eerste verdunning met oplosmiddel**

Volume verwijderde waterfase	$V_{\text{rec}}$	cm <sup>3</sup>				
Volume toegevoegd oplosmiddel	$\Delta V$	cm <sup>3</sup>				

**Eerste extractie met oplosmiddel**

Signaal geanalyseerd in oplosmiddel	$S_{\text{E1}}$	var.				
Concentratie teststof in oplosmiddel	$C_{\text{E1}}$	µg cm <sup>-3</sup>				
Massa van uit bodemmonster en wanden proefvat geëxtraheerde teststof	$m_{\text{E1}}$	µg				

**Tweede verdunning met oplosmiddel**

Volume verwijderd oplosmiddel	$\Delta V_s$	cm <sup>3</sup>				
Volume toegevoegd oplosmiddel	$\Delta V'$	cm <sup>3</sup>				

**Tweede extractie met oplosmiddel**

Signaal geanalyseerd in oplosmiddel	$S_{\text{E2}}$	var.				
Concentratie teststof in oplosmiddel	$C_{\text{E2}}$	µg cm <sup>-3</sup>				
Massa van uit bodemmonster en wanden proefvat geëxtraheerde teststof	$m_{\text{E2}}$	µg				
Totale massa in twee stappen geëxtraheerde teststof	$m_{\text{E}}$	µg				
Massabalans	MB	%				

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

**Adsorptie-isothermen**

	Symbol	Eenheid							
Buis nr.									
Gewicht bodemmonster	—	g							
Droge massa bodemmonster	E	g							
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	$V_{ws}$	cm <sup>3</sup>							
Volume 0,01 M CaCl <sub>2</sub> -oplossing voor equilibratie bodemmonster		cm <sup>3</sup>							
Volume toegevoegde stockoplossing		cm <sup>3</sup>							
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster (berekend)	$V_0$	cm <sup>3</sup>							
Concentratie oplossing	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>							
Equilibratietijd	—	uur							

**Na schudden en centrifugeren**

Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco	$C_{aq}^{ads} (eq)$	µg cm <sup>-3</sup>							
Temperatuur		°C							
Massa geadsorbeerde teststof per eenheid bodemmonster	$C_i^{ads} (eq)$	µg g <sup>-1</sup>							

Regressie-analyse:

Waarde van:  $K_F^{ads}$ :

Waarde van  $1/n$ :

Regressiecoëfficiënt  $r^2$ :

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

Gevolgd analysemethodologie: Indirect  Parallel  Serieel **Desorptietest**

		Symbol	Eenheid	Tijdsinterval	Tijdsinterval	Tijdsinterval	Tijdsinterval
Buis nr. uit adsorptiestap							
Massa aan het bodemmonster geadsorbeerde stof bij adsorptie-evenwicht		$m_s^{ads} (eq)$	$\mu g$				
Verwijderd volume waterfase, vervangen door 0,01 M CaCl <sub>2</sub>		$V_R$	$cm^3$				
Totaal volume waterfase in contact met bodem	PM	$V_0$	$cm^3$				
	SM	$V_T$	$cm^3$				
Massa stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht		$m_{aq}^A$	$\mu g$				

**Desorptiekinetiek**

Gemeten massa van de op het tijdstip $t_i$ uit het bodemmonster gedesorbeerde stof		$m_m^{des} (t_i)$	$\mu g$				
Volume van de oplossing die voor de meting van de teststof uit buis (i) is genomen	PM	$V_r^i$	$cm^3$				
	SM	$V_s^D$	$cm^3$				
Massa van de op het tijdstip $t_i$ uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (berekend)		$m_{aq}^{des} (t_i)$	$\mu g$				
Massa van de gedurende het tijdsinterval $\Delta t_i$ uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (berekend)		$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	$\mu g$				

**Desorptiepercentage**

Desorptie op het tijdstip $t_i$	$D_i$	%				
Desorptie gedurende het tijdsinterval $\Delta t_i$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Schijnbare desorptiecoëfficiënt	$K_{des}$					

PM: Parallele methode

SM: Seriele methode



## C.19. RAMING VAN DE ADSORPTIECOËFFICIËNT ( $K_{oc}$ ) AAN DE BODEM EN AAN RIOOLSLIB MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE (HPLC)

### 1. METHODE

Deze methode is overgenomen van OESO TG 121 (2000).

#### 1.1 INLEIDING

Het sorptiegedrag van stoffen ten opzichte van de bodem en van rioolslib kan worden beschreven aan de hand van parameters die langs experimentele weg worden bepaald met behulp van testmethode C.18. Een belangrijke parameter is de adsorptiecoëfficiënt, die wordt gedefinieerd als de verhouding tussen de concentratie van de stof in de bodem/het rioolslib en de concentratie van de stof in de waterfase bij het adsorptie-evenwicht. De genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor het organische-koolstofgehalte van de bodem  $K_{oc}$  is een bruikbare indicator van de bindingscapaciteit van een chemische stof aan organisch bodemmateriaal en rioolslib, en maakt vergelijkingen mogelijk tussen verschillende chemische stoffen. Deze parameter kan worden geraamd door middel van correlaties met de oplosbaarheid in water en de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Bij de in deze test beschreven onderzoeksmethode wordt gebruikgemaakt van HPLC voor de raming van de adsorptiecoëfficiënt  $K_{oc}$  aan de bodem en aan rioolslib (8). De ramingen zijn betrouwbaarder dan die op basis van KSAR-berekeningen (9). Aangezien deze onderzoeksmethode gebaseerd is op ramingen, kan zij de bij testmethode C.18 gebruikte batch-evenwichtsexperimenten niet volledig vervangen. Toch kan de geraamde  $K_{oc}$  van nut zijn bij de keuze van geschikte testparameters voor adsorptie-/desorptieonderzoeken volgens testmethode C.18 door de berekening van  $K_d$  (verdelingscoëfficiënt) of  $K_f$  (adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich) volgens vergelijking 3 (zie punt 1.2).

#### 1.2 DEFINITIES

$K_d$  : de verdelingscoëfficiënt wordt gedefinieerd als de verhouding van evenwichtsconcentraties  $C$  van een opgeloste teststof in een tweefasensysteem dat bestaat uit een sorptiemiddel (bodem of rioolslib) en een waterfase; deze coëfficiënt is een waarde zonder dimensies wanneer de concentraties in beide fasen worden uitgedrukt in gewicht/gewicht. Indien de concentratie in de waterfase wordt uitgedrukt in gewicht/volume, zijn de eenheden  $\text{mlg}^{-1}$ .  $K_d$  kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen en concentratieafhankelijk zijn.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ or } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

Hierbij is:

$C_{soil}$  = concentratie van de teststof in de bodem bij evenwicht ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$C_{sludge}$  = concentratie van de teststof in slib bij evenwicht ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$C_{aq}$  = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

$K_f$ : De adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich wordt gedefinieerd als de concentratie van de teststof in de bodem of in rioolslib ( $x/m$ ) wanneer de evenwichtsconcentratie  $C_{aq}$  in de waterfase gelijk is aan één; de eenheden zijn  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  sorptiemiddel. De waarde kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

Hierbij is:

$x/m$  = hoeveelheid teststof  $x$  ( $\mu\text{g}$ ) die is geadsorbeerd aan de hoeveelheid sorptiemiddel  $m$  ( $\text{g}$ ) bij evenwicht

$1/n$  = helling van de adsorptie-isotherm volgens Freundlich

$C_{aq}$  = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Bij  $C_{aq} = 1$ ;  $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

$K_{oc}$ : De verdelingscoëfficiënt ( $K_d$ ) of adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich ( $K_f$ ) genormaliseerd voor het organische-koolstofgehalte ( $f_{oc}$ ) van een sorptiemiddel; deze coëfficiënt is met name voor niet-geïoniseerde chemische stoffen een tamelijk nauwkeurige indicator voor de mate van adsorptie van een stof aan het sorptiemiddel en maakt vergelijkingen mogelijk tussen verschillende chemische stoffen. Afhankelijk van de dimensies van  $K_d$  en  $K_f$  kan  $K_{oc}$  dimensieloos zijn of de eenheden  $ml \cdot g^{-1}$  of  $\mu g \cdot g^{-1}$  organisch materiaal hebben.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (dimensieloos of } ml \cdot g^{-1}\text{) of } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Het verband tussen  $K_{oc}$  en  $K_d$  is niet altijd lineair;  $K_{oc}$ -waarden kunnen dan ook verschillen van bodemtype tot bodemtype, hoewel zij nauwelijks uiteenlopen vergeleken met  $K_d$ -of  $K_f$ -waarden.

De adsorptiecoëfficiënt ( $K_{oc}$ ) wordt afgeleid uit de capaciteitsfactor ( $k'$ ) aan de hand van een ijkcurve van  $\log k'$  versus  $\log K_{oc}$  van de geselecteerde referentieverbindingen.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

Hierbij is:

$t_R$ : HPLC-retentietijd van test- en referentiestof (minuten)

$t_0$ : dode tijd HPLC (minuten) (zie punt 1.8.2).

$P_{ow}$ : De verdelingscoëfficiënt octanol/water wordt gedefinieerd als de verhouding van de concentraties van opgeloste stof in n-octanol en water; dit is een dimensieloze waarde

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

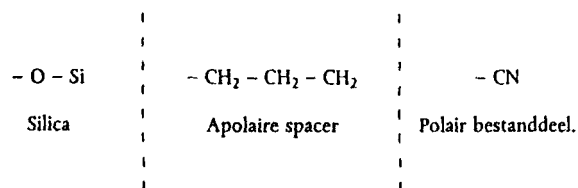
### 1.3 REFERENTIESTOFFEN

Voordat de methode wordt gebruikt, moeten de structuurformule, de zuiverheid en de dissociatieconstante (indien van toepassing) bekend zijn. Gegevens over de oplosbaarheid in water en organische oplosmiddelen, de verdelingscoëfficiënt octanol/water en de hydrolysekenmerken zijn nuttig.

Om de gemeten HPLC-retentiegegevens van een teststof te correleren aan de adsorptiecoëfficiënt  $K_{oc}$  van die stof, moet een ijkgrafiek van  $\log K_{oc}$  versus  $\log k'$  worden getekend. Er moet gebruik worden gemaakt van minimaal zes referentiepunten, waarvan ten minste één boven en ten minste één onder de verwachte teststofwaarde dient te liggen. De methode zal veel nauwkeuriger zijn als er referentiestoffen worden gebruikt die qua structuur verwant zijn aan de teststof. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, dient de gebruiker zelf geschikte ijkstoffen te kiezen. In dat geval moet een meer algemene reeks van qua structuur heterogene stoffen worden gekozen. Voor rioolslib zijn toegestane stoffen en  $K_{oc}$ -waarden opgenomen in tabel 1, voor de bodem in tabel 3 (zie aanhangsel). De eventuele keuze van andere ijkstoffen moet worden onderbouwd.

### 1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er wordt gebruikgemaakt van analytische HPLC-kolommen die zijn gevuld met een in de handel verkrijgbare vaste cyaanpropylfase die lipofiele en polaire bestanddelen bevat. Verder wordt een op een silicamatrix gebaseerde gematigd polaire stationaire fase gebruikt :



Het principe van de testmethode is hetzelfde als dat van testmethode A.8 (verdelingscoëfficiënt, HPLC-methode). Op het moment dat de teststof samen met de mobiele fase door de kolom stroomt, gaat die stof een interactie aan met de stationaire fase. De teststof wordt vertraagd als gevolg van de verdeling tussen mobiele en stationaire fasen. De tweeledige samenstelling van de stationaire fase — polaire en apolaire locaties — maakt dezelfde soort interactie tussen polaire en apolaire groepen van een molecuul mogelijk als bij organisch materiaal in bodem- of rioolslibmatrices. Op basis hiervan kan er een verband worden gelegd tussen de retentietijd in de kolom en de adsorptiecoëfficiënt aan organisch materiaal.

Met name bij polaire stoffen heeft de pH een belangrijke invloed op het sorptiegedrag. Bij landbouwgrond en reservoirs van rioolwaterzuiveringsinstallaties schommelt de pH gewoonlijk tussen 5,5 en 7,5. Voor ioniseerbare stoffen moeten er twee tests worden verricht met zowel geïoniseerde als niet-geïoniseerde vormen in geschikte bufferoplossingen, doch alleen in gevallen waarin ten minste 10 % van de testverbinding uiteen zal vallen binnen pH 5,5 tot 7,5.

Aangezien de evaluatie uitsluitend plaatsvindt op basis van het verband tussen de retentie in de HPLC-kolom en de adsorptiecoëfficiënt, is er geen kwantitatieve analysemethode nodig en behoeft slechts de retentietijd te worden bepaald. Indien er een geschikte reeks referentiestoffen beschikbaar is en de methode benut wordt onder standaard experimentele omstandigheden, vormt die methode een snelle en efficiënte manier om de adsorptiecoëfficiënt  $K_{oc}$  te ramen.

### 1.5 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De HPLC-methode kan worden gebruikt voor chemische stoffen (al dan niet gelabeld) waarvoor een geschikt detectiesysteem (b.v. spectrofotometer, radioactiviteitsdetector) beschikbaar is en die voldoende stabiel zijn gedurende het experiment. De methode kan zeer bruikbaar zijn voor chemische stoffen die moeilijk op een andere manier experimenteel te onderzoeken zijn (zoals vluchtige stoffen; stoffen die niet in water oplosbaar zijn in een concentratie die analyseerbaar is; stoffen met een sterke affiniteit tot het oppervlak van incubatiesystemen). De methode kan worden gebruikt voor mengsels die niet-opgeloste elutiebanden opleveren. In dat geval moeten de onder- en bovengrenzen van de  $\log K_{oc}$ -waarden van de verbindingen van het testmengsel worden vermeld.

Hoewel onzuiverheden soms problemen kunnen opleveren voor de interpretatie van HPLC-resultaten, zijn zij van ondergeschikt belang zolang de teststof duidelijk langs analytische weg kan worden geïdentificeerd en van de onzuiverheden kan worden gescheiden.

De methode is geldig verklaard voor de stoffen die zijn opgenomen in tabel 1 van het aanhangsel en is tevens gebruikt voor een aantal andere chemische stoffen, die behoren tot de volgende chemische categorieën :

- aromatische aminen (bijv. trifluralin, 4-chlooraniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naftylamine);
- aromatische carbonzuren esters (bijv. benzoëzure methylester, 3,5-dinitrobenzoëzure ethylester);
- aromatische koolwaterstoffen (bijv. toluen, xyleen, ethylbenzeen, nitrobenzeen);
- aryloxyfenoxypropionzuren esters (bijv. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl);
- schimmelwerende middelen en imidazol (bijv. carbendazim, fuberidazol, triazoxide);
- carbonzuren amiden (bijv. 2-chloorbenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide);
- chloorkoolwaterstoffen (bijv. endosulfan, DDT, hexachloorbenzeen, quintozeen, 1,2,3-trichloorbenzeen);
- organofosfor-insecticiden (bijv. azinfos-methyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos);
- fenolen (bijv. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachloorfenol, 2,4,6-trichloorfenol, 1-naftol);
- fenylureumderivaten (e.g. isoproturon, monolinuron, pencycuron);
- pigmentkleurstoffen (bijv. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- polyaromatische koolwaterstoffen (bijv. acenafteen, naftaleen);
- 1,3,5-triazine-herbiciden (bijv. prometryn, propazin, simazine, terbutryn);
- triazoolderivaten (bijv. tebuconazol, triadimefon, triadimenol, triapentenol).

De methode kan niet worden gebruikt voor stoffen die met het eluent of de stationaire fase reageren, en ook niet voor stoffen die een specifieke interactie aangaan met anorganische bestanddelen (bijv. vorming van clustercomplexen met kleimineralen). Het is mogelijk dat de methode niet werkt bij oppervlakte-actieve stoffen, anorganische verbindingen en matige of sterke organische zuren en basen. Er kunnen  $\log K_{oc}$ -waarden van 1,5 tot 5,0 worden bepaald. Ioniseerbare stoffen moeten worden gemeten met behulp van een gebufferde mobiele fase, waarbij er wel op moet worden gelet dat precipitatie van bufferbestanddelen of van de teststof wordt voorkomen.

### 1.6 KWALITEITSCRITERIA

#### 1.6.1 Nauwkeurigheid

Normaliter kan de adsorptiecoëfficiënt van een teststof worden geraamd tot binnen  $\pm 0,5$  log eenheid van de waarde die is bepaald met behulp van de batch-evenwichtsmethode (zie tabel 1 van het aanhangsel). Een hogere nauwkeurigheid is haalbaar als de gebruikte referentiestoffen qua structuur verwant zijn aan de teststof.

#### 1.6.2 Herhaalbaarheid

De bepalingen moeten ten minste in duplo worden uitgevoerd. De uit afzonderlijke metingen afgeleide waarden van  $\log K_{oc}$  moeten binnen een bereik van 0,25 log eenheid vallen.

#### 1.6.3 Reproduceerbaarheid

De ervaring die tot nu toe met de methode is opgedaan, ondersteunt de geldigheid ervan. Uit een onderzoek naar de HPLC-methode, waarbij gebruik werd gemaakt van 48 stoffen (merendeels pesticiden) waarvoor betrouwbare gegevens over  $K_{oc}$  in de bodem beschikbaar waren, kwam een correlatiecoëfficiënt van  $R = 0,95$  naar voren (10) (11).

Er is een vergelijkingstest onder elf laboratoria gehouden ter verbetering en validatie van de methode (12). De resultaten zijn vermeld in tabel 2 van het aanhangsel.

### 1.7 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

#### 1.7.1 Voorbereidende raming van de adsorptiecoëfficiënt

Daar de verdelingscoëfficiënt octanol/water  $P_{ow}$  ( $= K_{ow}$ ) en, in zekere mate, de oplosbaarheid in water met name bij niet-geïoniseerde stoffen kunnen worden gebruikt als indicatoren van de mate van adsorptie, kunnen zij tevens worden benut voor voorbereidende bereikbepaling. Er zijn een aantal bruikbare correlaties gepubliceerd voor verschillende groepen chemische stoffen (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

#### 1.7.2 Apparatuur

Vereist is een vloeistofchromatograaf met een pulsloze pomp en een geschikt detectieapparaat. Het gebruik van een injectieklep met injectielus wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van in de handel verkrijgbare chemisch gebonden cyaanpropylharsen op silicabasis (bijv. Hypersil en Zorbax CN). Er mag een voorkolom van hetzelfde materiaal tussen het injectiesysteem en de analysekolom worden geplaatst. Kolommen van verschillende leveranciers kunnen aanzienlijk uiteenlopen qua scheidingsefficiëntie. Als richtsnoer moeten de volgende capaciteitsfactoren  $k'$  worden gehaald :  $\log k' > 0,0$  voor  $\log K_{oc} = 3,0$  en  $\log k' > 0,4$  voor  $\log K_{oc} = 2,0$  bij gebruik van methanol/water 55/45 % als mobiele fase.

#### 1.7.3 Mobiele fasen

Van de diverse geteste mobiele fasen worden de twee volgende aanbevolen :

- methanol/water (55/45 % v/v);
- methanol/0,01M citraatbuffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

Er wordt gebruikgemaakt van een combinatie van methanol van HPLC-kwaliteit met gedestilleerd water of citraatbuffer voor de bereiding van het uitspoeloplosmiddel. Het mengsel wordt vóór gebruik ontgast. Er moet isocratische elutie worden toegepast. Als methanol/water-mengsels niet geschikt zijn kunnen ook andere organisch-oplosmiddel/water-mengsels worden uitgeprobeerd, zoals ethanol/water- of acetonitril/water-mengsels. Voor ioniseerbare verbindingen wordt het gebruik van een bufferoplossing aanbevolen om de pH te stabiliseren. Zoutprecipitatie en achteruitgang van de kolom, verschijnselen die zich kunnen voordoen bij sommige organische fase/buffer-mengsels moeten worden voorkomen.

Er mogen geen additieven zoals ionenpaarreagentia worden gebruikt, omdat die van invloed kunnen zijn op de sorptie-eigenschappen van de stationaire fase. Dergelijke veranderingen van de stationaire fase kunnen onomkeerbaar zijn. Daarom moeten experimenten waarbij additieven worden gebruikt, uitgevoerd worden op gescheiden kolommen.

#### 1.7.4 Oplossingen

De test- en referentiestoffen moeten worden opgelost in de mobiele fase.

#### 1.8 UITVOERING VAN DE TEST

##### 1.8.1 Testomstandigheden

De temperatuur tijdens de metingen moet worden geregistreerd. Temperatuurregeling van het kolomcompartiment wordt sterk aanbevolen teneinde constante omstandigheden te garanderen tijdens het ijken en ramen en het meten van de teststof.

##### 1.8.2 Bepaling van de dode tijd $t_0$

Voor deze bepaling kunnen twee methoden worden gebruikt (zie ook punt 1.2).

###### 1.8.2.1 Bepaling van de dode tijd $t_0$ door middel van een homologe reeks

Gebleken is dat deze procedure betrouwbare en gestandaardiseerde  $t_0$ -waarden oplevert. Zie voor nadere bijzonderheden testmethode A.8, Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water), HPLC-methode.

###### 1.8.2.2 Bepaling van de dode tijd $t_0$ door middel van inerte stoffen waarvan geen retentie door de kolom plaatsvindt

Deze techniek is gebaseerd op de injectie van oplossingen van formamide, ureum of natriumnitrat. De metingen moeten ten minste in duplo worden verricht.

##### 1.8.3 Bepaling van de retentietijden $t_R$

De referentiestoffen moeten worden gekozen zoals beschreven in punt 1.3. Ze mogen als gemengde standaard worden geïnjecteerd om hun retentietijden te bepalen, mits aangetoond is dat de retentietijd van elke referentiestandaard niet wordt beïnvloed door de aanwezigheid van de andere referentiestandaarden. Er dient regelmatig en in ieder geval tweemaal per dag te worden geïjkt teneinde rekening te kunnen houden met onvoorziene veranderingen in de prestaties van de kolom. Het verdient de voorkeur de ijkinjecties uit te voeren vóór en na de injecties van de teststof om er zeker van te zijn dat de retentietijden niet zijn gewijzigd. De teststoffen worden afzonderlijk in zo klein mogelijke hoeveelheden geïnjecteerd (om overlading van de kolom te voorkomen) en de retentietijden ervan worden bepaald.

Om het vertrouwen in de meting te vergroten moeten de bepalingen ten minste in duplo worden verricht. De uit afzonderlijke metingen afgeleide waarden van  $\log K_{oc}$  moeten binnen een bereik van 0,25 log eenheid vallen.

##### 1.8.4 Evaluatie

Uit de dode tijd  $t_0$  en de retentietijden  $t_R$  van de gekozen referentiestoffen worden de capaciteitsfactoren  $k'$  berekend volgens vergelijking 4 (zie punt 1.2). Daarna worden de  $\log k'$ -gegevens van de referentiestoffen uitgezet tegen hun  $\log K_{oc}$ -waarden in de tabellen 1 en 3 van het aanhangsel vermeldde  $\log K_{oc}$ -waarden die zijn verkregen bij batch-evenwichtsexperimenten. Aan de hand van deze curve wordt vervolgens de  $\log k'$ -waarde van een teststof gebruikt om de  $\log K_{oc}$ -waarde van die stof te bepalen. Als uit de actuele resultaten blijkt dat de  $\log K_{oc}$  van de teststof buiten het ijkgebied valt, moet de test worden herhaald met andere, geschiktere referentiestoffen.

#### 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

In het rapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

- identiteit van test- en referentiestoffen en hun zuiverheid, alsmede  $pK_a$ -waarden voorzover relevant;
- beschrijving van apparatuur en bedrijfsomstandigheden, bijvoorbeeld type en maat van analysekolom en voorkolom, detectieapparaat, mobiele fase (verhouding tussen bestanddelen en pH), temperatuurbereik tijdens de metingen;
- dode tijd en methode die wordt gebruikt voor de bepaling daarvan;
- in de kolom gebrachte hoeveelheden test- en referentiestoffen;
- retentietijden van referentieverbindingen die voor ijkdoeleinden worden gebruikt;
- nadere gegevens over de aangebrachte regressielijn ( $\log k'$  vs.  $\log K_{oc}$ ) en een grafiek van die lijn;
- gemiddelde-retentiegegevens en geraamde  $\log K_{oc}$ -waarde van de testverbinding;
- chromatogrammen.

#### 3. REFERENTIES

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp.1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp.227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp.297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp.831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp.833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp.121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils : Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp.1373-1384.

## AANHANGSEL

Tabel 1  
Vergelijking van  $K_{oc}$ -waarden voor bodem en rioolslib, en volgens de HPLC-screeningmethode (1), (2) berekende waarden

Stof	CAS-nr.	log $K_{oc}$ riooslib	log $K_{oc}$ HPLC	$\Delta$	Log $K_{oc}$ bodem	log $K_{oc}$ HPLC	$\Delta$
Atrazijn	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreen	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoëzure fenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichlooraniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

(1) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), blz.121 - 128.

(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), blz.107 — 119.

Tabel 2  
Resultaten van een vergelijkende laboratoriumtest (elf laboratoria) verricht ter verbetering en validatie van de HPLC-methode (1)

Stof	CAS-nr.	log $K_{oc}$ (OESO 106)	$K_{oc}$	log $K_{oc}$
			[HPLC-methode]	
Atrazijn	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

(1) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), blz.1373-1384.



Tabel 3

Aanbevolen referentiestoffen voor de HPLC-screeningmethode op basis van bodemadsorptiegegevens

Referentiestof	CAS-nr.	Gemiddelde log $K_{oc}$ -waarden van batchevenwicht	Aantal $K_{oc}$ -gegevens	log S.D.	Bron
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	( <sup>a</sup> )
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	( <sup>a</sup> )
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	( <sup>b</sup> )
N,N-dimethylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	( <sup>a</sup> )
4-Methylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	( <sup>a</sup> )
Methylbenzooat	93-58-3	1,80	4	1,08	( <sup>a</sup> )
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	( <sup>c</sup> )
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	( <sup>c</sup> )
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1,95	3	1,31	( <sup>b</sup> )
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	( <sup>a</sup> )
3,5-dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	( <sup>b</sup> )
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	( <sup>c</sup> )
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	( <sup>c</sup> )
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	( <sup>c</sup> )
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	( <sup>c</sup> )
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	( <sup>c</sup> )
Naftaleen	91-20-3	2,75	4	2,20	( <sup>a</sup> )
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	( <sup>c</sup> )
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	( <sup>c</sup> )
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	( <sup>a</sup> )
1,2,3-Trichloorbenzeen	87-61-6	3,16	4	1,40	( <sup>a</sup> )
$\gamma$ -HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	( <sup>a</sup> )
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	( <sup>c</sup> )
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	( <sup>a</sup> )
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	( <sup>c</sup> )
$\alpha$ -Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	( <sup>c</sup> )
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	( <sup>c</sup> )
Fenantreen	85-01-8	4,09	4	3,83	( <sup>a</sup> )
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	( <sup>a</sup> )
DDT	50-29-3	5,63	1	—	( <sup>b</sup> )

(<sup>a</sup>) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

(<sup>b</sup>) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, blz.285-304.

(<sup>c</sup>) Door de bedrijfstak verstrekte gegevens.

**C.20 DAPHNIA MAGNA VOORTPLANTINGSTEST****1. METHODE**

Deze methode voor het testen van de voortplantingstoxiciteit neemt OESO TG 211 (1998) integraal over.

**1.1 INLEIDING**

Het doel van de test is in de eerste plaats het beoordelen van het effect van chemicaliën op het voortplantingsresultaat van *Daphnia magna*.

**1.2 DEFINITIES EN EENHEDEN**

Moederdieren : de vrouwelijke *Daphnia* die aanwezig zijn bij aanvang van de test en voorwerp zijn van de studie naar het voortplantingsresultaat.

Nakomelingen : de jonge *Daphnia* die tijdens de test worden voortgebracht door de moederdieren.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) (concentratie waarbij het laagste effect wordt waargenomen) : de laagste testconcentratie van de stof waarbij een effect is waargenomen dat statistisch significant is voor de voortplanting en de mortaliteit van moederdieren (bij  $p < 0,05$ ) in vergelijking met de controle, binnen een aangegeven blootstellingsperiode. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd.

No Observed Effect Concentration (NOEC) (concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen) : de testconcentratie direct onder de LOEC, die in vergelijking met de controle geen statistisch significant effect heeft ( $p < 0,05$ ) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

EC<sub>x</sub> : de concentratie van de in water opgeloste teststof die resulteert in een  $a \times$  % vermindering van de voortplanting van *Daphnia magna* binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Intrinsieke groeisnelheid : een maat voor de groei van de populatie waarbij wordt uitgegaan van het voortplantingsresultaat en de leeftijdspecifieke mortaliteit (20) (21) (22). Bij stabiele populaties is die snelheid nul. Bij toenemende populaties is zij positief en bij afnemende populaties negatief. De laatstgenoemde populaties zijn uiteraard niet levensvatbaar en zullen uiteindelijk uitsterven.

Detectiegrens : de laagste concentratie die wel kan worden gedetecteerd doch niet gekwantificeerd.

Bepalingsgrens : de laagste concentratie die kwantitatief meetbaar is.

Mortaliteit : een dier wordt geregistreerd als gestorven als het immobiel is, d.w.z. als het niet tot zwemmen in staat is of als er geen beweging van aanhangsels of het postabdomen wordt waargenomen binnen 15 seconden na zachtjes bewegen van het testvat. (Gebruik van een andere definitie moet met bronvermelding worden vermeld).

**1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE**

Jonge vrouwelijke *Daphnia* (de moederdieren), die bij aanvang van de test nog geen 24 uur oud zijn, worden blootgesteld aan de teststof die aan het water is toegevoegd in een aantal uiteenlopende concentraties. De testduur is 21 dagen. Aan het eind van de test wordt het totale aantal voortgebrachte levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, geteld. Dit houdt in dat nakomelingen die zijn voortgebracht door volwassen dieren die tijdens de test sterven, niet worden meegeteld. Het voortplantingsresultaat van de moederdieren kan ook op andere manieren worden uitgedrukt (bijvoorbeeld in het aantal levende nakomelingen dat per dag en per dier is voortgebracht vanaf de eerste dag dat er nakomelingen werden waargenomen), maar die moeten dan wel worden vermeld naast het totale aantal nakomelingen dat per moederdier dat nog in leven was aan het eind van de test, werd voortgebracht. Het voortplantingsresultaat van de aan de teststof blootgestelde dieren wordt vergeleken met dat van de controlegroep(en) teneinde de Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) en daarmee ook de No Observed Effect Concentration (NOEC) te bepalen. Daarnaast vindt waar mogelijk data-analyse plaats met behulp van een regressiemodel om de concentratie te schatten die zou leiden tot een  $a \times$  % vermindering van het voortplantingsresultaat (d.w.z. EC<sub>50</sub>, EC<sub>20</sub> of EC<sub>10</sub>).

Het aantal overlevende moederdieren en de tijd die nodig was voor het voortbrengen van het eerste broedsel, moeten eveneens worden vermeld. Ook andere stofgerelateerde effecten op parameters als groei (bijvoorbeeld lengte) en mogelijke intrinsieke groeisnelheid kunnen voorwerp van onderzoek zijn.

**1.4 GEGEVENS OVER DE TESTSTOF**

Er moeten resultaten van een met *Daphnia magna* verrichte acute-toxiciteitstest (zie Methode C.2, deel I) beschikbaar zijn. Deze kunnen bruikbaar zijn bij de selectie van een geschikt aantal uiteenlopende testconcentraties voor de voortplantingstests. De oplosbaarheid in water en de dampspanning van de teststof moeten bekend zijn; tevens moet er een betrouwbare analysemethode beschikbaar zijn voor de kwantificering van de stof in de testoplossingen met vermelding van de herstelcapaciteit en de bepalingsgrens.

Voorbeelden van gegevens over de teststof die bruikbaar kunnen zijn bij de vaststelling van de testvoorwaarden zijn de structuurformule, de zuiverheidsgraad van de stof, de stabiliteit bij licht, de stabiliteit onder de testvoorwaarden, pKa, P<sub>ow</sub> en resultaten van de test betreffende gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C.4).

**1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST**

Wil de test geldig zijn, dan moet in de controlegroep(en) aan de volgende prestatiecriteria worden voldaan :

— de mortaliteit van de moederdieren (vrouwelijke *Daphnia*) mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 20 %;

— het gemiddelde aantal levende nakomelingen dat is voortgebracht per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, is  $\geq 60$ .

## 1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

### 1.6.1 Apparatuur

Testvaten en andere apparaten die in aanraking komen met de testoplossingen, mogen alleen uit glas of een ander chemisch inert materiaal bestaan. Normaal gesproken zijn de testvaten glazen bekiers.

Daarnaast zijn alle of sommige van de volgende apparaten vereist :

- zuurstofmeter (met micro-elektrode of andere geschikte voorzieningen voor de meting van opgeloste zuurstof in monsters met een klein volume);
- adequate apparatuur voor de temperatuurbeheersing;
- pH-meter;
- uitrusting voor de bepaling van de hardheid van water;
- uitrusting voor de bepaling van de totale organische koolstofconcentratie (TOC) van water of uitrusting voor de bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (COD);
- adequate apparatuur voor de regeling van het lichtregime en de meting van de lichtintensiteit.

### 1.6.2 Testorganisme

De testsoort is *Daphnia magna* Strauss. Andere *Daphnia*-soorten zijn eveneens toegestaan, mits ze aan de toepasselijke geldigheidscriteria voldoen (het geldigheidscriterium met betrekking tot het voortplantingsresultaat bij de controlegroepen moet relevant zijn voor de *Daphnia*-soort). Indien andere *Daphnia*-soorten worden gebruikt, moeten die duidelijk worden vermeld en dient dat gebruik te worden onderbouwd.

De kloon moet bij voorkeur zijn geïdentificeerd door middel van bepaling van het genotype. Uit onderzoek (1) is gebleken dat de voortplantingsprestatie van Kloon A (die afkomstig is van IRCHA in Frankrijk) (3) consequent voldoet aan het geldigheidscriterium van een gemiddelde van  $\geq 60$  nakomelingen per overlevend moederdier indien gekweekt onder de in deze methode beschreven voorwaarden. Desalniettemin zijn andere klonen aanvaardbaar mits de *Daphnia*-cultuur aantoonbaar voldoet aan de geldigheidscriteria voor een test.

Bij aanvang van de test mogen de dieren nog geen 24 uur oud zijn; ze mogen geen eerste nakomelingen zijn. Ze moeten afkomstig zijn van een gezonde stam (d.w.z. geen tekenen van stress vertonen, zoals hoge mortaliteit, aanwezigheid van mannelijke dieren en ephippia, vertraging in het voortbrengen van het eerste broedsel, verkleurde dieren enz.). De stamdieren moeten onder soortgelijke kweekomstandigheden (licht, temperatuur, medium, voeding en aantal dieren per eenheid) worden gehouden als die welke van toepassing zijn tijdens de test. Indien het tijdens de test te gebruiken *Daphnia*-kweekmedium afwijkt van het medium voor de gangbare *Daphnia*-cultuur, verdient het aanbeveling een aan de test voorafgaande acclimatiseringsperiode van normaliter circa drie weken (d.w.z. één generatie) aan te houden om stress bij de moederdieren te voorkomen.

### 1.6.3 Testmedium

Het verdient aanbeveling om bij deze test gebruik te maken van een volledig beschreven medium. Op die manier kan het gebruik van additieven vermeden worden (zoals zeewier, grondextract enz.), die moeilijk te typeren zijn, en kan er beter gestandaardiseerd worden tussen laboratoria. De media Elendt M4 (4) en M7 (zie aanhangsel 1) zijn hiertoe geschikt gebleken. Desalniettemin zijn andere media (bijvoorbeeld (5) en (6)) aanvaardbaar mits de prestaties van de *Daphnia*-cultuur aantoonbaar voldoen aan de geldigheidscriteria voor de test.

Indien gebruik wordt gemaakt van media met niet-beschreven additieven, moeten die additieven niet alleen duidelijk worden gespecificeerd, maar moeten er ook gegevens in het testrapport worden opgenomen over de samenstelling, in het bijzonder met betrekking tot het koolstofgehalte, aangezien dit een bijdrage kan leveren aan de voeding. Het verdient aanbeveling de totale organische koolstof (TOC) en/of het chemisch zuurstofverbruik (COD) van het stampreparaat van het organische additief te bepalen en een schatting te maken van de resulterende bijdrage aan TOC/COD in het testmedium. De TOC-niveaus in het medium (d.w.z. vóór toevoeging van de algen) zijn bij voorkeur lager dan 2 mg/l (7).

Ingeval van teststoffen met metalen moet worden onderkend dat de eigenschappen van het testmedium (bijvoorbeeld hardheid, chelaatvormend vermogen) van invloed kunnen zijn op de toxiciteit van de teststof. Een volledig beschreven medium is dan ook wenselijk. Op dit moment zijn er echter slechts twee volledig beschreven media waarvan bekend is dat ze geschikt zijn voor langetermijnkweek van *Daphnia magna*, Elendt M4 en M7. Beide media bevatten de chelaatvormer EDTA. Uit werkzaamheden is naar voren gekomen (2) dat de « klaarblijkelijke toxiciteit » van cadmium in de regel lager is wanneer de voortplantingstest wordt uitgevoerd in M4- en M7-media dan bij uitvoering in media die geen EDTA bevatten. M4 en M7 worden derhalve niet aanbevolen voor metaalhoudende teststoffen, terwijl ook het gebruik van andere media die bekende chelaatvormers bevatten, vermeden dient te worden. Het kan raadzaam zijn om voor metaalhoudende stoffen een ander medium te gebruiken, zoals volgens ASTM geregenereerd hard schoon water (7), dat geen EDTA bevat, met toevoeging van zeewierextract (8). Deze combinatie van volgens ASTM geregenereerd hard schoon water en zeewierextract is ook geschikt voor langetermijnkweek en het testen van *Daphnia magna* (2), hoewel die combinatie nog altijd een licht chelaatvormende werking heeft vanwege de organische component in het toegevoegde zeewierextract.

Bij aanvang en tijdens de test moet de concentratie opgeloste zuurstof boven 3 mg/l liggen. De pH moet liggen tussen 6-9 en normaliter mag er geen variatie van meer dan 1,5 eenheid optreden bij welke test ook. Een hardheid van meer dan 140 mg/l (als  $\text{CaCO}_3$ ) wordt aanbevolen. Uit tests op dit niveau en de hierboven beschreven tests is naar voren gekomen dat de voortplantingsprestatie voldoet aan de geldigheidscriteria (9) (10).

### 1.6.4 Testoplossingen

Testoplossingen van de gekozen concentraties worden in de regel bereid middels verdunning van een stamplossing. Stampoplossingen moeten bij voorkeur worden bereid door oplossing van de stof in het testmedium.

In sommige gevallen kan het gebruik van organische oplosmiddelen of dispergeermiddelen nodig zijn om een voldoende geconcentreerde stampoplossing te maken, maar het gebruik van dergelijke middelen moet waar mogelijk worden voorkomen. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen zijn aceton, ethanol, methanol, dimethylformamide en triëthyleenglycol. Voorbeelden van geschikte dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % en HCO-40. De teststof in de testoplossingen mag in geen geval de grens van de oplosbaarheid in het testmedium overschrijden.

Oplosmiddelen worden gebruikt voor de productie van een stamoplossing die nauwkeurig in water kan worden gedoseerd. Bij de aanbevolen oplosmiddelconcentratie in het uiteindelijke testmedium (d.w.z.  $\leq 0,1$  ml/l) zijn bovengenoemde oplosmiddelen niet toxisch en leiden ze niet tot een hogere oplosbaarheid in water van een stof.

Dispergeermiddelen kunnen een goed hulpmiddel zijn bij een nauwkeurige dosering en dispersie. Bij de aanbevolen concentratie in het uiteindelijke testmedium ( $\leq 0,1$  ml/l) zijn bovengenoemde dispergeermiddelen niet toxisch en leiden ze niet tot een hogere oplosbaarheid in water van een stof.

#### 1.7 TESTOPZET

De behandelingen moeten alle plaatsvinden in een speciaal voor de desbetreffende behandeling bestemd testvat en de testvaten moeten daarna op willekeurige wijze worden behandeld. Het nalaten hiervan kan een vertekend beeld geven dat uitgelegd zou kunnen worden als een concentratie-effect. In het bijzonder moet hierbij gedacht worden aan de mogelijkheid dat, wanneer met experimentele units wordt omgegaan in volgorde van behandeling of concentratie, bepaalde met tijd verband houdende effecten, zoals vermoeidheid bij de uitvoerder van het experiment of andere fouten, kunnen leiden tot het vaststellen van grotere effecten bij de hogere concentraties. Bovendien zou overwogen moeten worden de test af te breken als de testresultaten beïnvloed kunnen worden door een conditie waarvan reeds sprake was bij aanvang van de test of door een omgevingsconditie, zoals de plaats in het laboratorium.

#### 1.8 PROCEDURE

##### 1.8.1 Blootstellingsomstandigheden

###### 1.8.1.1 Duur

De test duurt 21 dagen.

###### 1.8.1.2 Kwantiteit

De moederdieren worden afzonderlijk, d.w.z. één per testvat, in de vaten ondergebracht met 50 - 100 ml medium in elk vat.

Soms kunnen grotere volumes nodig zijn om te voldoen aan de eisen van de analytische procedure die wordt gebruikt voor de bepaling van de teststofconcentratie, hoewel het bundelen van replicatieonderzoeken voor chemische analyse ook is toegestaan. Bij gebruik van volumes van meer dan 100 ml dient de hoeveelheid voer die aan de Daphnia wordt gegeven, eventueel te worden verhoogd om ervoor te zorgen dat er voldoende voer aanwezig is en dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria. Bij doorstroomtests mag om technische redenen voor een andere opzet worden gekozen (bijvoorbeeld vier groepen van tien dieren in een groter testvolume), mits eventuele wijzigingen in de testopzet in het testrapport worden vermeld.

###### 1.8.1.3 Aantal dieren

Bij semi-statische tests, ten minste tien dieren afzonderlijk gehouden bij elke testconcentratie en ten minste 10 dieren afzonderlijk gehouden in de controlereeks.

Wat doorstroomtests betreft is gebleken dat een aantal van 40, in vier groepen van 10 verdeelde dieren bij elke testconcentratie geschikt is (1). Een kleiner aantal testorganismen is toegestaan; een minimum van 20 dieren per concentratie verdeeld over twee of meer replicatieonderzoeken met een gelijk aantal dieren (bijvoorbeeld vier replicatieonderzoeken met elk vijf watervlooiën) wordt aanbevolen. Opgemerkt dient te worden dat het bij tests waar dieren in groepen worden gehouden, niet mogelijk is het voortplantingsresultaat uit te drukken in het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, als er moederdieren sterven. In die gevallen moet dat resultaat worden uitgedrukt in het « totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat bij aanvang van de test aanwezig was ».

###### 1.8.1.4 Voeding

Bij semi-statische tests moet er bij voorkeur dagelijks worden gevoerd, doch in ieder geval driemaal per week (d.w.z. naar gelang van de verandering van medium). Indien hiervan wordt afgeweken (bijvoorbeeld bij doorstroomtests), moet dat in het testrapport worden vermeld.

Tijdens de test moet de voeding van de moederdieren bij voorkeur bestaan uit levende algencellen of ten minste één van de volgende bestanddelen : *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (tegenwoordig *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) en *Scenedesmus subspicatus*. Uitgangspunt bij de voeding moet de aan elk moederdier toegediende hoeveelheid organische koolstof (C) zijn. Uit onderzoek (12) is gebleken dat een hoeveelheid van 0,1 à 0,2 mg C/Daphnia/dag voor *Daphnia magna* voldoende is om een zodanig aantal nakomelingen te krijgen dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria voor de test. De voeding kan worden gegeven in een gelijkmatige, over de gehele testperiode uitgesmeerde hoeveelheid of desgewenst in een lagere hoeveelheid bij aanvang van de test, die daarna wordt opgevoerd teneinde rekening te houden met de groei van de moederdieren. Ook in dat geval moet de hoeveelheid echter altijd binnen de aanbevolen hoeveelheid van 0,1 — 0,2 mg C/Daphnia/dag blijven.

Indien er gebruik moet worden gemaakt van alternatieve middelen, zoals algencelaantal of lichtabsorptie, om aan de vereiste hoeveelheid voeding te komen (d.w.z. gemakshalve, aangezien de meting van het koolstofgehalte tijdrovend is), moet elk laboratorium zijn eigen nomografie opstellen waarin het alternatieve middel wordt gerelateerd aan het koolstofgehalte van de algencultuur (zie aanhangsel 2 voor suggesties inzake het opstellen van een nomografie). Nomografieën moeten ten minste eenmaal per jaar worden gecontroleerd, doch vaker als de algencultuuromstandigheden zijn gewijzigd. Gebleken is dat lichtabsorptie een beter alternatief voor het koolstofgehalte is dan het celaantal (13).

Er dient een geconcentreerde algensuspensie te worden toegediend aan de Daphnia om de hoeveelheid algenkweekmedium die in de testvaten wordt overgebracht, zoveel mogelijk te beperken. De algen kunnen worden geconcentreerd door middel van centrifugeren, gevolgd door hersuspensie in gedistilleerd water, gedeïoniseerd water of Daphnia-kweekmedium.

###### 1.8.1.5 Licht

16 Uren licht met een intensiteit van ten hoogste  $15-20 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

###### 1.8.1.6 Temperatuur

De temperatuur van de testmedia moet liggen tussen 18-22 °C. Waar mogelijk moet de temperatuur echter bij geen enkele test met meer dan 2 °C variëren binnen dit bereik (bijvoorbeeld 18-20, 19-21 of 20-22 °C). Voor de controle van de temperatuur kan het dienstig zijn een extra testvat te gebruiken.

#### 1.8.1.7 Beluchting

De testvaten mogen niet worden belucht tijdens de test.

#### 1.8.2 Testconcentratie

Normaliter moeten er ten minste vijf testconcentraties worden bereid in een meetkundige reeks met een scheidingsfactor die bij voorkeur niet hoger is dan 3,2, en moet voor elke testconcentratie het juiste aantal replicatieonderzoeken worden uitgevoerd (zie punt 1.8.1.3). Het eventuele gebruik van minder dan vijf concentraties moet worden beargumenteerd. Stoffen mogen niet worden getest boven de grens van hun oplosbaarheid in het testmedium.

Bij de vaststelling van het concentratiebereik moet aandacht worden geschonken aan het volgende :

i. Als het de bedoeling is de LOEC/NOEC vast te stellen, moet de laagste testconcentratie zo laag zijn dat de vruchtbaarheid bij die concentratie niet significant lager is dan die van de controlegroep. Als dat niet het geval is, moet de test worden herhaald met een lagere laagste concentratie.

ii. Als het de bedoeling is de LOEC/NOEC vast te stellen, moet de hoogste testconcentratie zo hoog zijn dat de vruchtbaarheid bij die concentratie significant lager is dan die van de controlegroep. Als dat niet het geval is, moet de test worden herhaald met een hogere hoogste concentratie.

iii. Indien een schatting wordt gemaakt van de  $EC_x$  betreffende effecten op de voortplanting, is het raadzaam om een dusdanig aantal concentraties te gebruiken dat de  $EC_x$  met voldoende zekerheid kan worden bepaald. Indien een schatting wordt gemaakt van de  $EC_{50}$  betreffende effecten op de voortplanting, is het raadzaam dat de hoogste testconcentratie groter is dan deze  $EC_{50}$ . Als niet op deze wijze te werk wordt gegaan zal — hoewel de  $EC_{50}$  nog steeds geschat kan worden — het betrouwbaarheidsinterval van de  $EC_{50}$  erg breed worden, en is wellicht ook niet goed te beoordelen of het model wel voldoet.

iv. Het testconcentratiebereik moet bij voorkeur geen concentraties omvatten die statistisch gezien een significant effect hebben op overleving van volwassen dieren, aangezien de aard van de test daarmee zou veranderen van een eenvoudige voortplantingstest in een gecombineerde voortplantings- en mortaliteitstest, die een veel complexere statistische analyse vergt.

Voorafgaande kennis over de toxiciteit van de teststof (bijvoorbeeld op basis van een acute test en/of op verdelingsgerichte studies) kan een goed hulpmiddel zijn bij de selectie van de juiste testconcentraties.

Indien een oplosmiddel of dispergeermiddel wordt gebruikt bij de bereiding van testoplossingen (zie punt 1.6.4), mag de uiteindelijke concentratie in de testvaten niet hoger zijn dan 0,1 ml/l en moet die bovendien in alle testvaten dezelfde zijn.

#### 1.8.3 Controles

Ter aanvulling op de testreeks moet er één testmediumcontrolereeks en, indien relevant, één controlereeks met het oplosmiddel of het dispergeermiddel worden uitgevoerd. Indien gebruikt moet de oplosmiddel- of dispergeermiddelconcentratie dezelfde zijn als in de vaten met de teststof. Het juiste aantal replicatieonderzoeken moet worden verricht (zie punt 1.8.1.3).

Bij een goed uitgevoerde test moet de coëfficiënt van de variatie rond het gemiddelde aantal levende nakomelingen per moederdier in de controlegroep(en) in de regel  $\leq 25\%$  zijn; dit moet worden vermeld voor elke testopzet waarbij gebruik wordt gemaakt van afzonderlijk gehouden dieren.

#### 1.8.4 Verversing van het testmedium

De frequentie waarmee het medium wordt verversed hangt af van de stabiliteit van de teststof, maar moet ten minste driemaal per week zijn. Indien uit voorafgaande stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de teststofconcentratie niet stabiel is (d.w.z. buiten het bereik van 80 - 120 % van de nominale concentratie of dalend tot onder 80 % van de gemeten beginconcentratie) gedurende de maximale verversingsperiode (d.w.z. drie dagen), moet worden overwogen het medium vaker te verversen of gebruik te maken van een doorstroomtest.

Wanneer het medium wordt verversed in semi-statische tests, wordt een tweede reeks testvaten bereid waarin de moederdieren worden overgebracht door middel van bijvoorbeeld een glazen pipet met een geschikte diameter. De hoeveelheid met de *Daphnia* overgebracht medium moet zo klein mogelijk zijn.

#### 1.8.5 Observaties

De resultaten van de observaties gedurende de test moeten worden vermeld op informatiebladen

(zie de voorbeelden in de aanhangsels 3 en 4). Indien er nog andere metingen gedaan moeten worden (zie de punten 1.3 en 1.8.8), zijn er mogelijk meer observaties nodig.

#### 1.8.6 Nakomelingen

De door elk moederdier voortgebrachte nakomelingen moeten bij voorkeur dagelijks worden verwijderd en geteld vanaf het moment dat het eerste broedsel verschijnt, teneinde te voorkomen dat ze voer opeten dat voor de volwassen dieren is bestemd. Hoewel in het kader van deze methode alleen het aantal levende nakomelingen moet worden geteld, moet ook de aanwezigheid van niet-uitgekomen eitjes of dode nakomelingen worden vermeld.

#### 1.8.7 Mortaliteit

De mortaliteit onder de moederdieren moet bij voorkeur dagelijks worden geregistreerd, en ten minste op dezelfde tijdstippen als de telling van de nakomelingen.

#### 1.8.8 Andere parameters

Hoewel deze methode voornamelijk bedoeld is voor de beoordeling van de effecten op de voortplanting, kunnen er mogelijk ook andere effecten in zodanige mate worden gekwantificeerd dat statistische analyse mogelijk is. Groeimetingen zijn zeer wenselijk aangezien zij informatie verschaffen over mogelijke subletale effecten, welke gegevens soms bruikbaar zijn dan voortplantingsmetingen alleen; de meting van de lengte van de moederdieren (d.w.z. de lichaamslengte met uitzondering van het anale uiteinde) aan het eind van de test wordt aanbevolen. Andere te meten of te berekenen parameters zijn de tijd die nodig is om het eerste broedsel (en de daaropvolgende broedsels) voort te brengen, aantal en omvang van de nakomelingen per dier, aantal niet-uitgekomen eitjes, aanwezigheid van mannelijke dieren of ephippia en de intrinsieke groeisnelheid van de populatie.



### 1.8.9 Frequentie van analytische bepalingen en metingen

De zuurstofconcentratie, temperatuur, hardheid en pH-waarden moeten ten minste eenmaal per week worden gemeten, in verse en oude media, in de controle(s) en in de hoogste teststofconcentratie.

Tijdens de test worden de concentraties van de teststof regelmatig bepaald.

Bij semi-statische tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting binnen  $\pm 20\%$  van de nominale waarde zal blijven (d.w.z. binnen het bereik van 80 - 120 %, zie 1.4 en 1.8.4), verdient het aanbeveling de hoogste en laagste testconcentraties in ieder geval te analyseren bij de verse bereiding ervan alsmede eenmaal bij verversing in de eerste week van de test (d.w.z. analyses moeten worden verricht op een monster van een en dezelfde oplossing — bij verse bereiding en bij verversing). Daarna moeten deze bepalingen in ieder geval wekelijks worden herhaald.

Bij tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting niet binnen  $\pm 20\%$  van de nominale waarde zal blijven, moeten alle testconcentraties zowel bij de verse bereiding als bij verversing worden geanalyseerd. Bij tests echter waarbij de gemeten beginconcentratie van de teststof weliswaar niet binnen  $\pm 20\%$  van de nominale waarde ligt, maar wel naar tevredenheid kan worden aangetoond dat de beginconcentraties herhaalbaar en stabiel zijn (d.w.z. binnen het bereik van 80 - 120 % van de beginconcentraties), kunnen de chemische bepalingen in de weken 2 en 3 van de test worden beperkt tot de hoogste en laagste testconcentraties. In alle gevallen hoeft de bepaling van teststofconcentraties vóór de verversing slechts op één replicatieonderzoekvat bij elke testconcentratie te worden uitgevoerd.

Bij doorstroomtests is een gelijksoortige monstermethode van toepassing als bij semi-statische tests (met dien verstande dat de meting van oplossingen hier niet van toepassing is). Desalniettemin kan het raadzaam zijn meer monsters te nemen in de eerste week (bijvoorbeeld via drie reeksen metingen) om te bewerkstelligen dat de testconcentraties stabiel blijven. Bij dit soort testen moet de doorstromingssnelheid van het oplosmiddel en de teststof dagelijks worden gecontroleerd.

Als er voldoende aanwijzingen zijn dat de concentratie van de te testen stof gedurende de gehele test en naar tevredenheid binnen  $\pm 20\%$  van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op nominale of gemeten beginwaarden. Indien de afwijking van de nominale of gemeten beginconcentratie groter is dan  $\pm 20\%$ , moeten de resultaten worden uitgedrukt in tijdgewogen gemiddelde (zie aanhangsel 5).

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1 VERWERKING VAN DE RESULTATEN

Het doel van de test is het bepalen van het effect van de teststof op het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is. Het totale aantal nakomelingen per moederdier moet per testvat worden berekend (d.w.z. via replicatieonderzoek). Als bij een replicatieonderzoek het moederdier sterft tijdens de test of als het blijkt te gaan om een mannelijk dier, wordt dat replicatieonderzoek niet meegenomen in de analyse. De analyse zal in dat geval worden gebaseerd op een lager aantal replicatieonderzoeken.

Voor de schatting van de LOEC — en daarmee de NOEC — met betrekking tot de effecten van de chemische stof op het voortplantingsresultaat moet het gemiddelde voortplantingsresultaat van alle replicatieonderzoeken bij elke concentratie en de gebundelde reststandaardafwijking worden berekend aan de hand van variantieanalyse (ANOVA). Vervolgens moet per concentratie het gemiddelde worden vergeleken met het controlegemiddelde aan de hand van een geschikte meervoudige-vergelijkingsmethode. Geschikt zijn de Dunnett- of Williams-test (14) (15) (16) (17). Gecontroleerd moet worden of de binnen de ANOVA gehanteerde aanname betreffende de variantiehomogeniteit stand houdt. Dit kan beter langs grafische weg worden gedaan dan middels een formele significantietest (18); een Bartlett-test is een geschikt alternatief. Als de aanname geen stand houdt moet transformatie van gegevens worden overwogen om de varianties vóór de ANOVA te homogeniseren of om een gewogen ANOVA uit te voeren. De omvang van het met behulp van ANOVA waarneembare effect (d.w.z. het geringste significante verschil) moet worden berekend en vermeld.

Voor de schatting van de concentratie die zou leiden tot een achteruitgang met 50 % van het voortplantingsresultaat (d.w.z. de  $EC_{50}$ ), moet voor de gegevens een geschikte kromme — bijvoorbeeld een logistische kromme — worden uitgezet met behulp van een statistische methode zoals die van de kleinste kwadraten. De parameters van de kromme kunnen zo worden gekozen dat de  $EC_{50}$  en de standaardafwijking daarvan direct kunnen worden geschat, waarmee de berekening van de betrouwbaarheidsgrenzen betreffende de  $EC_{50}$  aanzienlijk kan worden vereenvoudigd. Tenzij er goede redenen zijn om de voorkeur te geven aan verschillende betrouwbaarheidsniveaus, moeten tweezijdig 95 % betrouwbaarheidsgrenzen worden vermeld. De procedure moet bij voorkeur voorzien in een methode voor de beoordeling van de significantie van het « gebrek aan fit ». Dit kan langs grafische weg geschieden, of door middel van verdeling van de restom van de kwadraten in « gebrek aan fit » en « zuivere afwijkingcomponenten » en uitvoering van een significantietest inzake dat « gebrek aan fit ». Aangezien behandelingen die leiden tot een hoge vruchtbaarheid waarschijnlijk een grotere variatie in het aantal voortgebrachte nakomelingen hebben dan behandelingen die leiden tot een lage vruchtbaarheid, moet weging van de vastgestelde waarden om de verschillende varianties in de verschillende behandelingsgroepen tot uitdrukking te brengen, in overweging worden genomen (zie voor achtergrondinformatie ref. 18).

Bij de analyse van de gegevens van de eindringtest (2) is een logistische kromme uitgezet aan de hand van het volgende model, waarbij moet worden aangetekend dat ook andere geschikte modellen gebruikt mogen worden :

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

waarin :

Y : het totale aantal nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven was (berekend per vat)

x : de stofconcentratie

c : het verwachte aantal nakomelingen wanneer  $x = 0$

$x_0$  : de  $EC_{50}$  in de populatie

b : de hellingsparameter

In de meeste situaties zal dit model naar alle waarschijnlijkheid voldoen, maar er zijn ook tests waar dat niet opgaat. De geldigheid van het hierboven voorgestelde model moet worden gecontroleerd. In sommige gevallen kan een hormesismodel waarin lage concentraties sterkere effecten sorteren, uitkomst bieden (19).

Ook concentraties betreffende andere effecten zoals de  $EC_{10}$  of  $EC_{20}$  kunnen worden geschat, zij het dat het wellicht beter is andere parameters voor het model te kiezen dan die welke worden gebruikt bij de schatting van de  $EC_{50}$ .

## 2.2 TestRapport

Het testrapport moet het volgende omvatten :

### 2.2.1 Teststof

- fysische kenmerken en relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische identificatiegegevens, waaronder de zuiverheid.

### 2.2.2 Testsoort

— de kloon (ongeacht of die genetisch getypeerd is), leverancier of bron (voorzover bekend) en de toegepaste culturomstandigheden. Als gebruik wordt gemaakt van een andere soort dan *Daphnia magna*, moet dit worden gerapporteerd en beargumenteerd.

### 2.2.3 Testomstandigheden

- toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statisch of doorstroom, volume, hoeveelheid *Daphnia* per liter);
- fotoperiode en lichtintensiteit;
- testopzet (bijvoorbeeld aantal replicatieonderzoeken, aantal moederdieren per replicatieonderzoek);
- bijzonderheden over het gebruikte kweekmedium;
- voorzover gebruikt, toevoegingen van organisch materiaal, met inbegrip van de samenstelling, bron, bereidingsmethode, TOC/COD van stamoplossingen, schatting van de resulterende TOC/COD in het testmedium;
- gedetailleerde informatie over voeding, waaronder de hoeveelheid (in mg C/*Daphnia*/dag) en het schema (bijvoorbeeld soort voer, met inbegrip van de specifieke naam (soort) wat de algen betreft en, voorzover bekend, de stam en de kweekomstandigheden);
- bereidingsmethode van stamoplossingen en frequentie van de verversing (indien gebruikt moeten het oplosmiddel en het dispergeermiddel alsmede de concentratie ervan worden vermeld).

### 2.2.4 Resultaten

- resultaten van eventuele voorafgaande studies naar de stabiliteit van de teststof;
- de nominale testconcentraties en de resultaten van alle analyses ter bepaling van de concentratie van de teststof in de testvaten (zie voorbeeld informatiebladen in aanhangsel 4); de herstelcapaciteit van de methode en de bepalingsgrens moeten ook worden gerapporteerd;
- waterkwaliteit in de testvaten (d.w.z. pH, temperatuur en opgeloste-zuurstofconcentratie, en TOC en/of COD en hardheid waar van toepassing) (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 3);
- de volledige gegevens over de levende nakomelingen per moederdier (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 3);
- sterftcijfer onder de moederdieren en de dag(en) waarop de sterfte plaatsvond (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 3);
- de variatiecoëfficiënt van de vruchtbaarheid in de controlegroep (gebaseerd op het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven was);
- grafische voorstelling van het totale aantal levende nakomelingen per moederdier (voor elk replicatieonderzoek) dat nog in leven was aan het eind van de test afgezet tegen de concentratie van de teststof;
- de Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) voor de voortplanting, inclusief een beschrijving van de toegepaste statistische procedures en een indicatie van de omvang van het effect dat zou kunnen worden waargenomen, alsmede de No Observed Effect Concentration (NOEC) voor de voortplanting; waar van toepassing moet ook de LOEC/NOEC betreffende de mortaliteit van de moederdieren worden vermeld;
- voorzover van toepassing, de  $EC_x$  betreffende de voortplanting en betrouwbaarheidsintervallen en een grafiek van het voor de berekening daarvan gehanteerde model, de helling van de dosis-respons-curve en de standaardafwijking daarvan;
- andere waargenomen biologische effecten of metingen : vermelding van eventuele andere biologische effecten die werden waargenomen of gemeten (bijvoorbeeld groei van moederdieren), met inbegrip van eventuele passende onderbouwing;
- een toelichting op eventuele afwijkingen van de testmethode.

## 3. REFERENTIES

- (1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 maart 1993.
- (2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- (3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, blz.257-265.
- (4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Strauss. *Protoplasma*, 154, blz.25-33.
- (5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- (6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, blz.775-782.
- (7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 blz.
- (8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Strauss for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In : Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) blz. 144-148.
- (9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26, blz. 1-8.
- (10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables : salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2), blz. 185-196.
- (11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. *Biologice Prace*, 36, 209.
- (12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, blz. 2053-2058.
- (13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton : the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, blz. 459-466.
- (14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, blz. 1096-1121.

- (15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, blz. 482-491.
- (16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, blz. 103-117.
- (17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, blz. 510-531.
- (18) Draper N.R. and Smith H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, N.Y.
- (19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, blz. 93-96.
- (20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). *A Primer of Population Biology*. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (21) Poole R.W. (1974). *An Introduction to quantitative Ecology*. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, blz. 532.
- (22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates : Jackknife vs bootstrap techniques. *Ecology*, 67, blz. 1156-1166.

Aanhangsel 1

**BEREIDING VAN VOLLEDIG BESCHREVEN MEDIA ELENDT M7 EN M4**

**Acclimatisering aan Elendt M7- en Elendt M4-media**

Sommige laboratoria hebben problemen ondervonden bij het rechtstreeks overbrengen van *Daphnia* in M4- (1) en M7-media. Toch is er enig succes geboekt met geleidelijke acclimatisering, d.w.z. overgang van het eigen medium naar 30 % Elendt, vervolgens naar 60 % Elendt en tot slot naar 100 % Elendt. Soms is een acclimatiseringsperiode van een volle maand nodig.

**BEREIDING**

**Spoorelementen**

Afzonderlijke stamoplossingen (I) van individuele spoorelementen worden eerst bereid in water met een geschikte zuiverheid, d.w.z. gedeïoniseerd, gedistilleerd of omgekeerde osmose. Uit deze verschillende stamoplossingen (I) wordt een enkelvoudige stamoplossing (II) bereid, die alle spoorelementen bevat (gecombineerde oplossing), te weten :

Stamoplossingen I (enkelvoudige stof)	Aan water toegevoegde hoeveelheid (mg/l)	Concentratie (in relatie tot medium M4) (-voudig)	Ter bereiding van de gecombineerde stamoplossing II de volgende hoeveelheid stamoplossing I aan water toevoegen (ml/l)	
			M 4	M 7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	5 000	2 000	—	—
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1 991	2 000	—	—

Zowel de Na<sub>2</sub>EDTA- als FeSO<sub>4</sub>-oplossingen worden enkelvoudig bereid, samengebracht en onmiddellijk met een autoclaaf gesteriliseerd. Hiermee wordt verkregen :

21 Fe-EDTA-oplossing		1 000	20,0	5,0
----------------------	--	-------	------	-----

**M4- en M7-media**

M4- en M7-media worden als volgt bereid met behulp van stamoplossing II, macro-nutriënten en vitamines :

	Aan water toegevoegde hoeveelheid (mg/l)	Concentratie (in relatie tot medium M4) (-voudig)	Toegevoegde hoeveelheid stamoplossing ter bereiding van medium (ml/l)	
			M 4	M 7
Stamoplossing II gecombineerde spoorelementen		20	50	50
Macro-nutriëntstamoplossingen				
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> * 9 H <sub>2</sub> O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	10 000	0,1	0,1
Gecombineerde vitaminestamoplossing	—	10 000	0,1	0,1
De gecombineerde vitaminestamoplossing wordt bereid door toevoeging van de 3 vitamines aan 1 liter water, zoals hieronder weergegeven :				
Thiaminehydrochloride	750	10 000	—	—
Cyanocobalamine (B <sub>12</sub> )	10	10 000	—	—
Biotine	7,5	10 000	—	—

De gecombineerde vitaminestamoplossing wordt in bevroren toestand bewaard in kleine fracties. De vitamines worden kort vóór gebruik aan de media toegevoegd.

N.B. Voeg, ter voorkoming van zoutneerslag bij de bereiding van de volledige media, de fracties van de stamoplossingen toe aan circa 500 - 800 ml gedeïoniseerd water en vul daarna aan tot 1 liter.

Zie voor de eerste publicatie betreffende het M4-medium Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Strauss. *Protoplasma*, 154, blz. 25-33.

## Aanhangsel 2

**TOTALE ORGANISCHE KOOLSTOF (TOC) ANALYSE EN OPSTELLING VAN EEN NOMOGRAFIE  
VOOR  
TOC-GEHALTE VAN ALGENVOEDING**

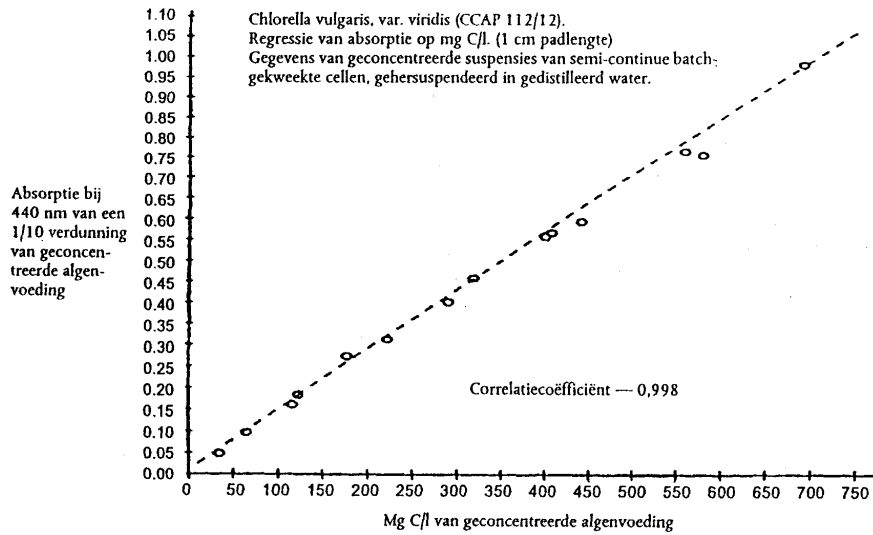
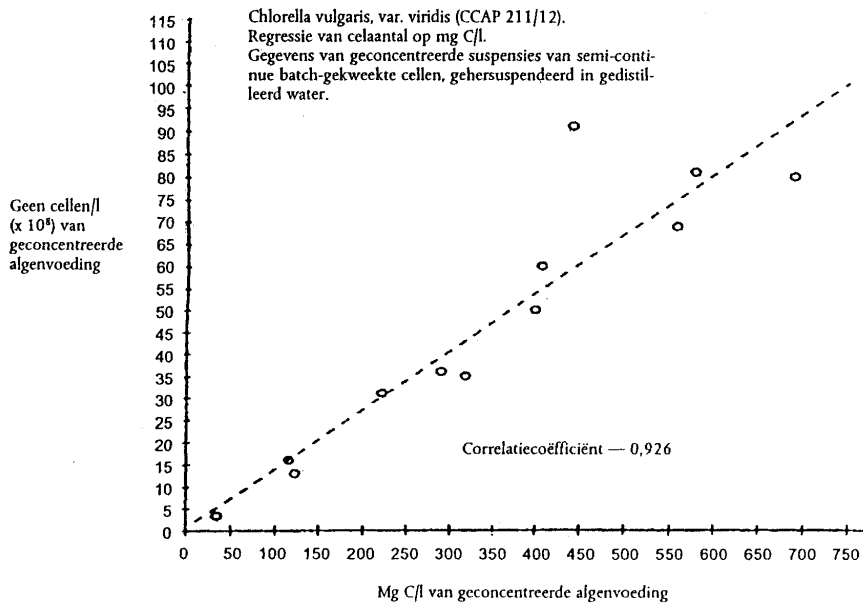
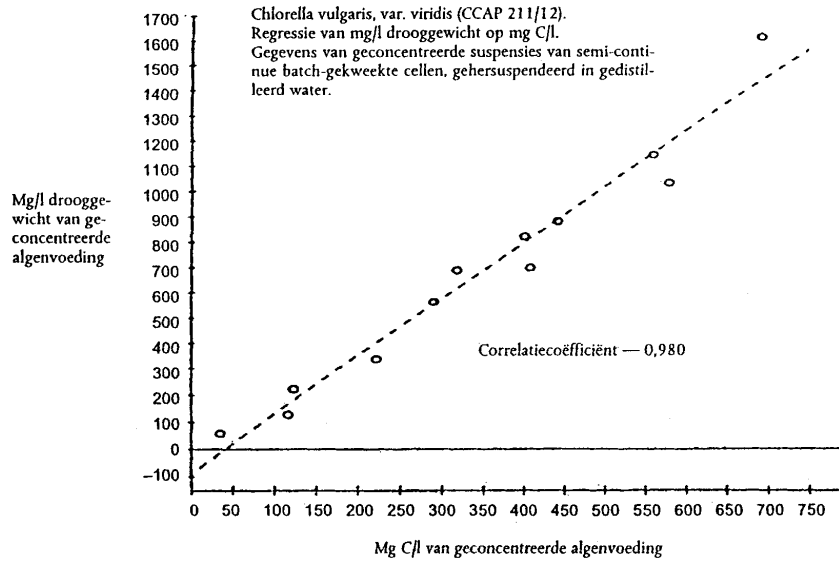
Normaal gesproken wordt het koolstofgehalte van de algenvoeding niet rechtstreeks gemeten, maar afgeleid uit correlaties (d.w.z. nomografieën) met alternatieve middelen als algencelaantal of lichtabsorptie.

De TOC moet worden gemeten via hogetemperatuuroxidatie en niet met methoden op basis van UV of persulfaat. (Zie : The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, Londen WC1V 6HB).

Voor het opstellen van nomografieën moeten algen middels centrifugeren worden gescheiden van het groeimedium, gevolgd door hersuspensie in gedistilleerd water. De surrogaatparameter en de TOC-concentratie moet in elk monster driemaal worden gemeten. Blanco's van gedistilleerd water moeten worden geanalyseerd; de TOC-concentratie moet worden afgeleid uit die van het algenmonster.

De nomografie moet lineair zijn over het vereiste koolstofconcentratiebereik. Voorbeelden zijn hieronder weergegeven.

N.B. Deze grafieken mogen niet worden gebruikt voor conversiedoeleinden; het is van wezenlijk belang dat laboratoria hun eigen nomografieën opstellen.







Aanhangsel 4

VOORBEELD INFORMATIEBLAD VOOR REGISTRATIE VAN RESULTATEN CHEMISCHE ANALYSE

(a) Gemeten concentraties

Nominale concentratie	Monster week 1		Monster week 2		Monster week 3	
	Vers	Oud	Vers	Oud	Vers	Oud

(b) Gemeten concentraties als percentage van nominale concentratie

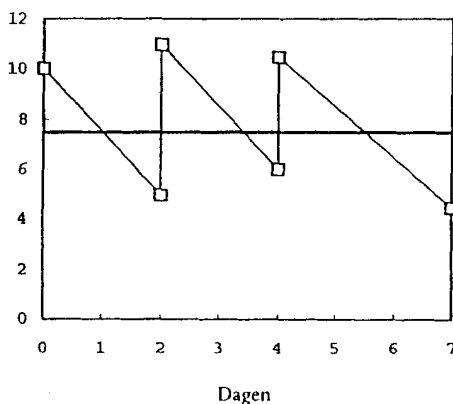
Nominale concentratie	Monster week 1		Monster week 2		Monster week 3	
	Vers	Oud	Vers	Oud	Vers	Oud

Aanhangsel 5

BEREKENING TIJDGEWOGEN GEMIDDELDE

Tijdgewogen gemiddelde

Daar de concentratie van de teststof in de periode tussen de mediumverversingen kan afnemen, moet goed worden bekeken welke concentratie moet worden gekozen als representatief voor het concentratiebereik dat wordt ondergaan door de Daphnia-moerdieren. Deze keuze moet gebaseerd zijn op biologische én statistische overwegingen. Als bijvoorbeeld wordt aangenomen dat de voortplanting vóór alles wordt beïnvloed door de piekconcentratie, moet de maximumconcentratie worden gebruikt. Wanneer men er daarentegen van uitgaat dat het geaccumuleerde of langeretermijneffect van de toxische stof belangrijker is, is een gemiddelde concentratie relevanter. In dat geval is de tijdgewogen gemiddelde concentratie geschikt, aangezien daarbij rekening wordt gehouden met de variatie van de momentane concentratie over een bepaalde tijdsperiode.



Figuur 1 : Voorbeeld van tijdgewogen gemiddelde

Figuur 1 laat een voorbeeld zien van een (vereenvoudigde) test over zeven dagen met mediumverversing op dag 0, 2 en 4.

— De dunne zigzaglijn geeft de concentratie op enig tijdstip weer. Als vooronderstelling geldt dat de concentratie daalt volgens een exponentieel achteruitgangsproces.

— De zes vierkantjes geven de waargenomen concentraties weer zoals gemeten aan het begin en einde van elke verversingsperiode.

— De dikke, ononderbroken lijn geeft het tijdgewogen gemiddelde weer.

Het tijdgewogen gemiddelde wordt zo berekend dat het oppervlak onder dat gemiddelde gelijk is aan het oppervlak onder de concentratiekromme. Zie onderstaande tabel 1 voor de berekening van dit voorbeeld.

Tabel 1 : Berekening van het tijdgewogen gemiddelde

Verversing nr.	Dagen	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Oppervlak
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.767
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.781
Totaal Dagen : 7					Totaal Oppervlak	50.091
					Tijdgewogen gemiddelde	7.156

« Dagen » : het aantal dagen in de verversingsperiode

« Conc0 » : de gemeten concentratie aan het begin van elke verversingsperiode

« Conc1 » : de gemeten concentratie aan het einde van elke verversingsperiode

« Ln(Conc0) » : de natuurlijke logaritme van Conc0

« Ln(Conc1) » : de natuurlijke logaritme van Conc1

« Oppervlak » : het oppervlak onder de exponentiële kromme voor elke verversingsperiode. Het wordt berekend aan de hand van de volgende formule :

$$\text{Oppervlak} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{dagen}$$

Het tijdgewogen gemiddelde is het « Totaal Oppervlak » gedeeld door het « Totaal Dagen. »

Voor de toepasbaarheid op de Daphnia-voortplantingstest zou de tabel uiteraard moeten worden uitgebreid en betrekking moeten hebben op een periode van 21 dagen.

Het is duidelijk dat niet bevestigd kan worden dat het achteruitgangsproces inderdaad exponentieel is als de waarnemingen alleen plaatsvinden aan het begin en einde van elke verversingsperiode. Een andere kromme zou resulteren in een andere berekening van het Oppervlak. Hoe dan ook, het is alleszins plausibel uit te gaan van een exponentieel achteruitgangsproces en de weergegeven kromme is waarschijnlijk het beste alternatief bij gebrek aan andere gegevens.

Toch is de nodige voorzichtigheid geboden als geen enkele stof wordt aangetroffen bij de chemische analyse aan het eind van de verversingsperiode. Als niet ingeschat kan worden hoe snel de stof uit de oplossing verdwenen is kan er ook geen realistisch oppervlak onder de kromme worden vastgesteld, en dus ook geen aannemelijk tijdgewogen gemiddelde.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

## BIJLAGE II

### Bijlage VI

#### ALGEMENE CRITERIA VOOR DE INDELING EN HET KENMERKEN VAN GEVAARLIJKE STOFFEN EN PREPARATEN

##### Inhoud

1. ALGEMENE INLEIDING
2. INDELING OP BASIS VAN FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN
  - 2.1. Inleiding
  - 2.2. Criteria voor de indeling, keuze van symbolen, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingsszinnen
    - 2.2.1. Ontploffbaar
    - 2.2.2. Oxiderend
    - 2.2.3. Zeer licht ontvlambaar
    - 2.2.4. Licht ontvlambaar
    - 2.2.5. Ontvlambaar
    - 2.2.6. Andere fysisch-chemische eigenschappen

3. INDELING OP BASIS VAN TOXICOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN
  - 3.1. Inleiding
  - 3.2. Criteria voor de indeling, keuze van symbolen, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingssinnen
    - 3.2.1. Zeer vergiftig
    - 3.2.2. Vergiftig
    - 3.2.3. Schadelijk
    - 3.2.4. Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van R48
    - 3.2.5. Bijtend
    - 3.2.6. Irriterend
    - 3.2.7. Sensibiliserend
    - 3.2.8. Andere toxicologische eigenschappen
4. INDELING OP BASIS VAN SPECIFIEKE EFFECTEN OP DE GEZONDHEID VAN DE MENS
  - 4.1. Inleiding
  - 4.2. Criteria voor de indeling, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingssinnen
    - 4.2.1. Kankerverwekkende stoffen
    - 4.2.2. Mutagene stoffen
    - 4.2.3. Voor de voortplanting vergiftige stoffen
    - 4.2.4. Procedure voor de indeling van preparaten in verband met specifieke effecten op de gezondheid
5. INDELING OP BASIS VAN MILIEUEFFECTEN
  - 5.1. Inleiding
  - 5.2. Criteria voor de indeling, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingssinnen
    - 5.2.1. Aquatisch milieu
    - 5.2.2. Niet-aquatisch milieu
6. KEUZE VAN VEILIGHEIDSAANBEVELINGEN
  - 6.1. Inleiding
  - 6.2. Veiligheidsaanbevelingen voor stoffen en preparaten
7. ETIKETTERING
8. SPECIALE GEVALLEN : Stoffen
  - 8.1. Mobiele gascilinders
  - 8.2. Gascilinders bedoeld voor propaan, butaan of vloeibaar petroleumgas (LPG)
  - 8.3. Metalen in massieve vorm
  - 8.4. Stoffen waaraan zin R65 is toegekend
9. SPECIALE GEVALLEN : Preparaten
  - 9.1. Gasvormige preparaten (gasmengsels)
  - 9.2. Gascilinders bedoeld voor preparaten die propaan, butaan of vloeibaar petroleumgas (LPG) bevatten waaraan een stinkende stof is toegevoegd
  - 9.3. Legeringen, preparaten die polymeren bevatten, preparaten die elastomeren bevatten
  - 9.4. Preparaten waaraan zin R65 is toegekend
  - 9.5. Organische peroxiden
  - 9.6. Aanvullende etiketteringseisen voor bepaalde preparaten

#### 1. ALGEMENE INLEIDING

1.1. Het doel van de indeling is alle fysisch-chemische, toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen van stoffen en preparaten die bij normaal gebruik een gevaar kunnen opleveren, te inventariseren. Nadat (een) gevaarlijke eigenschap(en) is/zijn vastgesteld, dient de stof of het preparaat, om het gevaar (de gevaren) aan te geven, zo te worden geëtiketteerd dat de gebruiker, het grote publiek en het milieu worden beschermd.

1.2. In deze bijlage worden de grondbeginselen behandeld voor het indelen en het kenmerken van de stoffen en preparaten die worden bedoeld in artikel 3, § 3 van dit besluit en in artikel 4 van het KB van 11 januari 1993 en andere relevante besluiten inzake gevaarlijke preparaten.

Zij is bedoeld voor eenieder (fabrikant, importeur, nationale overheden) die betrokken is bij de indeling en de etikettering van gevaarlijke stoffen en preparaten.

1.3. De voorschriften van dit besluit en van het KB van 11 januari 1993 beogen het grote publiek en beroepsmatig betrokkenen op wezenlijke punten voorlichting te geven over gevaarlijke stoffen en preparaten. Het etiket vestigt de aandacht van degenen die met stoffen en preparaten omgaan, op de gevaren van sommige van deze materialen.

Het etiket kan tevens de aandacht vestigen op elders beschikbare, meer uitgebreide informatie over de veiligheid en het gebruik van producten.

1.4. In de vermeldingen op het etiket wordt rekening gehouden met alle mogelijke gevaren bij normaal gebruik van gevaarlijke stoffen en preparaten in de vorm waarin zij in de handel worden gebracht, maar niet noodzakelijk in elke andere uiteindelijke gebruiksvorm, bijvoorbeeld in verdunde toestand. De ernstige gevaren worden aangegeven met symbolen; daarnaast worden niet alleen deze gevaren maar ook die welke voortvloeien uit andere gevaarlijke eigenschappen aangeduid met waarschuwingssymbolen, terwijl in veiligheidsaanbevelingen aanwijzingen worden gegeven voor de noodzakelijke voorzorgsmaatregelen.

Bij stoffen wordt de informatie aangevuld met de naam van de stof volgens een internationaal erkende chemische-stoffennomenclatuur, waarbij de in de Europese inventaris van bestaande chemische handelsstoffen (Einecs) of de Europese lijst van genotificeerde stoffen (Elincs) gebruikte naam de voorkeur verdient, met het EG-nummer en met de naam, het adres en het telefoonnummer van de in de Gemeenschap gevestigde persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van de stof.

Bij preparaten wordt de informatie overeenkomstig artikel 9, §2, van het KB van 11 januari 1993 aangevuld met :

- de benaming of handelsnaam van het preparaat;
- de chemische benaming van de in het preparaat aanwezige stof(fen); en
- de naam, het volledige adres en het telefoonnummer van de in de Gemeenschap gevestigde persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van het preparaat.

1.5. Op grond van artikel 3 § 4 dienen fabrikanten van, handelaars in en importeurs van gevaarlijke stoffen die wel in Einecs maar nog niet in bijlage I zijn opgenomen, een onderzoek in te stellen teneinde kennis te nemen van de bestaande relevante en toegankelijke gegevens betreffende de eigenschappen van die stoffen. Aan de hand van die gegevens moeten zij die stoffen verpakken en voorlopig kenmerken overeenkomstig artikelen 7 en 8 en de criteria van deze bijlage.

#### 1.6. Voor de indeling en de etikettering vereiste gegevens

1.6.1. Voor stoffen kunnen de voor de indeling en de etikettering benodigde gegevens als volgt worden verkregen :

(a) als het gaat om stoffen waarvoor inlichtingen volgens bijlage VII nodig zijn, komen de meeste voor de indeling en de etikettering benodigde gegevens voor in het « basisdossier ». De indeling en de etikettering moeten, wanneer nieuwe gegevens beschikbaar komen (bijlage VIII), zo nodig worden herzien.

(b) ten aanzien van de overige stoffen (bijvoorbeeld de stoffen als bedoeld in punt 1.5) kunnen de voor de indeling en de etikettering benodigde gegevens in voorkomend geval worden ontleend aan een aantal uiteenlopende bronnen, zoals bijvoorbeeld :

- de resultaten van vroeger onderzoek;
- inlichtingen uit hoofde van internationale regelingen voor het vervoer van gevaarlijke stoffen;
- gegevens uit referentiewerken en uit de literatuur; of
- gegevens verkregen uit praktijkervaring.

De resultaten van gevalideerde structuur-activiteitrelaties en de mening van deskundigen kunnen indien nodig ook in beschouwing worden genomen.

1.6.2. Voor preparaten kunnen de voor de indeling en de etikettering benodigde gegevens doorgaans als volgt worden verkregen :

(a) als het gaat om fysisch-chemische gegevens, door toepassing van de in bijlage V genoemde methoden. Dit geldt eveneens voor preparaten waarop het KB van 28 februari 1994 van toepassing is, tenzij andere internationaal erkende methoden aanvaardbaar zijn overeenkomstig het bepaalde in de bijlagen VII en VIII van het KB van 28 februari 1994 (artikel 5, § 1, punt 1.5 van het KB van 11 januari 1993). Voor gasvormige preparaten kan voor ontvlambare en oxiderende eigenschappen een berekeningsmethode worden gebruikt (zie de punten 9.1.1.1 en 9.1.1.2). Voor niet-gasvormige preparaten die organische peroxiden bevatten, kan een berekeningsmethode worden gebruikt voor de oxiderende eigenschappen (zie punt 2.2.2.1).

(b) als het gaat om gegevens over effecten op de gezondheid :

— door toepassing van de in bijlage V genoemde methoden, tenzij, in het geval van gewasbeschermingsmiddelen, andere internationaal erkende methoden aanvaardbaar zijn overeenkomstig het bepaalde in de bijlagen VII en VIII van het KB van 28 februari 1994 (artikel 5, § 2, punt 2.1, b), van het KB van 11 januari 1993);

— en/of door toepassing van een in artikel 5 § 2 en bijlage I, deel B, deel 1.1 tot en met 1.6 en deel 2.1 tot en met 2.5 van het KB van 11 januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode; of

— in geval van R65, door toepassing van de onder punt 3.2.3 genoemde regels;

— wanneer het echter de beoordeling van kankerverwekkende, mutagene of voor de voortplanting vergiftige eigenschappen betreft, door toepassing van een in artikel 5, § 2 en bijlage I, deel B, deel 1.7 tot en met 1.9 en deel 2.6 van het KB van 11 januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode.

(c) als het gaat om gegevens over ecotoxicologische eigenschappen :

(i) uitsluitend wat betreft de toxiciteit voor het aquatisch milieu :

— door toepassing van de in bijlage V genoemde methoden voorzover aan de in bijlage I, deel C, deel 3 van het KB van 11 januari 1993 bedoelde voorwaarden wordt voldaan, tenzij, in het geval van gewasbeschermingsproducten, andere internationaal erkende methoden aanvaardbaar zijn overeenkomstig het bepaalde in de bijlage VII en VIII van het KB van 28 februari 1994 [art 5, § 3, punt 3.1, b, van het KB van 11 januari 1993] of

— door toepassing van een in artikel 5, § 3 en in bijlage I, deel C, delen 1 en 2 van het KB van 11 januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode;

(ii) voor de bepaling van de potentie van bioaccumulatie (of de feitelijke bioaccumulatie) aan de hand van  $\log P_{ow}$  (of BCF), of voor de bepaling van de afbreekbaarheid, door toepassing van een in artikel 5, § 3 en in bijlage I, deel C delen 1 en 2 van het KB van 11 januari 1993, bedoelde gebruikelijke methode;

(iii) wat betreft de gevaren voor de ozonlaag, door toepassing van een in artikel 5, § 3 en in bijlage I, deel C, delen 1 en 2, van het KB van januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode.

Opmerking betreffende de uitvoering van dierproeven

Bij de uitvoering van dierproeven voor het verkrijgen van experimentele gegevens gelden de bepalingen van het KB van 14 november 1993 betreffende de bescherming van proefdieren gewijzigd door het koninklijk besluit van 15 mei 2001.

Opmerking betreffende de fysisch-chemische eigenschappen

Voor organische peroxiden en preparaten van organische peroxiden kan voor het verkrijgen van gegevens de in punt 9.5 uiteengezette berekeningsmethode worden gebruikt. Voor gasvormige preparaten kan voor de ontvlambare en oxiderende eigenschappen een berekeningsmethode worden gebruikt (zie hoofdstuk 9).

#### 1.7. TOEPASSING VAN DE CRITERIA

De indeling moet zowel de fysisch-chemische als de toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen van de stoffen en preparaten omvatten.

Het indelen van stoffen en preparaten geschiedt overeenkomstig punt 1.6 op basis van de criteria van de hoofdstukken 2 tot en met 5 (stoffen) en de hoofdstukken 2, 3, 4 (punt 4.2.4) en 5 van deze bijlage. Alle soorten gevaren moeten in beschouwing worden genomen; indeling bijvoorbeeld onder 3.2.1 betekent dus niet dat met de punten 3.2.2 en 3.2.4 geen rekening hoeft te worden gehouden.

De keuze van symbolen en waarschuwingszinnen geschiedt op basis van de indeling om ervoor te zorgen dat de specifieke aard van de bij de indeling vastgestelde mogelijke gevaren op het etiket wordt weergegeven.

Onverminderd de criteria van de punten 2.2.3, 2.2.4 en 2.2.5 gelden voor stoffen en preparaten in aërosolvorm de bepalingen van het KB van 14 april 1978 betreffende aërosols als gewijzigd en aangepast aan de vooruitgang van de techniek.

##### 1.7.1. Definities

« Stoffen » zijn chemische elementen en hun verbindingen, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het product en alle onzuiverheden ten gevolge van het productieproces, doch met uitsluiting van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd.

Een stof kan chemisch duidelijk omschreven (bijvoorbeeld aceton) dan wel een complex mengsel van bestanddelen van uiteenlopende samenstelling (bijvoorbeeld aromatische distillaten) zijn. Bij een aantal complexe stoffen zijn bepaalde afzonderlijke bestanddelen geïdentificeerd.

« Preparaten » zijn mengsels of oplossingen die uit twee of meer stoffen bestaan.

##### 1.7.2. Toepassing van de criteria voor stoffen

De in deze bijlage genoemde criteria zijn rechtstreeks van toepassing wanneer de gegevens zijn verkregen met behulp van testmethoden die vergelijkbaar zijn met de testmethoden van bijlage V. In andere gevallen moeten de beschikbare gegevens worden beoordeeld door vergelijking van de gebruikte testmethoden met de testmethoden van bijlage V en met de in de onderhavige bijlage gegeven regels voor het bepalen van de juiste criteria voor de indeling en de etikettering.

In sommige gevallen kan er twijfel zijn over de toepassing van de desbetreffende criteria, vooral wanneer daarvoor een beroep moet worden gedaan op de mening van deskundigen. In dat geval dienen de fabrikanten, de handelaars en de importeurs de stoffen voorlopig in te delen en te etiketteren op basis van een beoordeling van de gegevens door een bevoegd persoon.

Onverminderd het bepaalde in artikel 3, § 4 kan, wanneer bovengenoemde procedure is gevolgd en er bezorgdheid is over mogelijke tegenstrijdigheden, een voorstel worden ingediend om de voorlopige indeling op te nemen in bijlage I. Het voorstel moet worden ingediend bij een van de lidstaten en vergezeld gaan van de nodige wetenschappelijke gegevens (zie ook punt 4.1).

Een gelijkaardige procedure kan worden gevolgd wanneer er gegevens komen die reden geven tot bezorgdheid over de juistheid van een bestaande vermelding in bijlage I.

##### 1.7.2.1. Indeling van stoffen die onzuiverheden, additieven of afzonderlijke bestanddelen bevatten

Wanneer in stoffen onzuiverheden, additieven of afzonderlijke bestanddelen zijn geïdentificeerd, worden deze in beschouwing genomen als de concentratie ervan gelijk is aan of hoger is dan :

— 0,1 % voor stoffen die zijn ingedeeld als zeer giftig, vergiftig, kankerverwekkend (categorie 1 of 2), mutageen (categorie 1 of 2), vergiftig voor de voortplanting (categorie 1 of 2) of gevaarlijk voor het milieu (waaraan het symbool "N" is toegekend wegens gevaar voor het aquatisch milieu; gevaarlijk voor de ozonlaag);

— 1 % voor stoffen die zijn ingedeeld als schadelijk, bijtend, irriterend, sensibiliserend, kankerverwekkend (categorie 3), mutageen (categorie 3), vergiftig voor de voortplanting (categorie 3) of gevaarlijk voor het milieu (waaraan het symbool "N" niet is toegekend, d.w.z. schadelijk voor in het water levende organismen, op lange termijn mogelijk schadelijke effecten veroorzakend),

tenzij in bijlage I lagere waarden worden opgegeven.

Met uitzondering van de stoffen die specifiek in bijlage I worden genoemd, dient de indeling te geschieden conform het bepaalde in het artikel 5, § 1, § 2 en § 3 van het KB van 11 januari 1993.

Voor asbest (650-013-00-6) geldt deze algemene regel pas als er in bijlage I een concentratiegrens is vastgesteld. Stoffen die asbest bevatten, moeten worden ingedeeld en geëtiketteerd overeenkomstig de bepalingen van artikel 3, § 4 van dit besluit.

##### 1.7.3. Toepassing van de criteria voor preparaten

De in deze bijlage genoemde criteria zijn rechtstreeks van toepassing wanneer de gegevens zijn verkregen met behulp van testmethoden vergelijkbaar met de testmethoden van bijlage V, met uitzondering van die criteria van hoofdstuk 4 waarvoor alleen de gebruikelijke methode geldt. Gebruikelijke methoden zijn ook van toepassing ten aanzien van de criteria van hoofdstuk 5, met uitzondering van de toxiciteit voor het aquatisch milieu, onverminderd de in bijlage I, deel C, deel 3 van het KB van 11 januari 1993 gegeven voorschriften. Voor preparaten die vallen binnen de werkingssfeer van het KB van 28 februari 1994 zijn met het oog op de indeling en de etikettering ook gegevens die met andere internationaal erkende methoden werden verkregen, aanvaardbaar (zie de specifieke bepalingen in punt 1.6 van deze bijlage). In andere gevallen moeten de beschikbare gegevens worden beoordeeld door vergelijking van de gebruikte testmethoden met de testmethoden van bijlage V en met de in de onderhavige bijlage gegeven regels voor het bepalen van de juiste criteria voor de indeling en de etikettering.



Wanneer de gevaren voor de gezondheid en voor het milieu worden beoordeeld door toepassing van een in de artikelen 5, § 2 en § 3 en in de bijlage I, deel B en deel C van het KB van 11 januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode, moeten de afzonderlijke concentratiegrenzen worden gebruikt die worden vermeld in :

- bijlage I van dit besluit, of
- bijlage I, deel B deel 2 en/of bijlage I, deel C, deel 2 van het KB van 11 januari 1993 wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I van dit besluit voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder bijbehorende concentratiegrenzen.

Voor preparaten die gasmengsels bevatten, geschiedt de indeling in verband met de effecten op de gezondheid en het milieu met behulp van de berekeningsmethode op basis van de afzonderlijke concentratiegrenzen uit bijlage I van dit besluit of, wanneer die grenzen niet in bijlage I worden genoemd, op basis van de criteria van de bijlagen I, delen B en C van het KB van 11 januari 1993.

#### 1.7.3.1. *Preparaten of in 1.7.2.1 omschreven stoffen die worden gebruikt als bestanddelen van een ander preparaat*

Dergelijke preparaten moeten conform de bepalingen van artikel 9 overeenkomstig de in de artikelen 3 en 4 van het KB van 11 januari 1993 omschreven beginselen worden geëtiketteerd. In bepaalde gevallen zijn de gegevens op het etiket van het preparaat of de in punt 1.7.2.1 omschreven stof evenwel onvoldoende om andere fabrikanten, die dat preparaat of die stof als bestanddeel van hun eigen preparaat (preparaten) gebruiken, in staat te stellen hun preparaat (preparaten) correct in te delen en te etiketteren.

In die gevallen dient de in de Gemeenschap gevestigde persoon die voor het in de handel brengen van het oorspronkelijke preparaat of de in punt 1.7.2.1 omschreven stof verantwoordelijk is, of het nu de fabrikant, de importeur of de distributeur is, op gerechtvaardigd verzoek zo snel mogelijk alle noodzakelijke gegevens over de aanwezige gevaarlijke stoffen te verstrekken teneinde een correcte indeling en etikettering van het nieuwe preparaat mogelijk te maken. Deze gegevens zijn ook nodig om de persoon die voor het in de handel brengen van het nieuwe preparaat verantwoordelijk is in staat te stellen aan andere eisen van het KB van 11 januari 1993 te voldoen.

## 2. INDELING OP BASIS VAN FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN

### 2.1. Inleiding

De in bijlage V opgenomen testmethoden met betrekking tot de ontplofbare, de ontvlambare en de oxiderende eigenschappen dienen tot nadere uitwerking van de definities van artikel 1, §4, onder a) tot en met e). De criteria vloeien rechtstreeks voort uit de testmethoden van bijlage V, voorzover die daar zijn vermeld.

Indien er voldoende aanwijzingen zijn dat de fysisch-chemische eigenschappen van de stoffen en preparaten - met uitzondering van organische peroxiden - in de praktijk afwijken van het resultaat volgens de testmethoden van bijlage V, dan worden deze stoffen en preparaten ingedeeld overeenkomstig hun eventuele gevaren voor degenen die met deze stoffen en preparaten omgaan of voor andere personen.

### 2.2. Criteria voor de indeling, keuze van symbolen, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingszinnen

Bij preparaten dienen de in artikel 5, §1 van het KB van 11 januari 1993 genoemde criteria in beschouwing te worden genomen.

#### 2.2.1. Ontplofbaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als ontplofbaar en gekenmerkt met het symbool "E" en de gevaarsaanduiding "ontplofbaar" overeenkomstig de resultaten van de tests van bijlage V en voorzover de stoffen en preparaten ontplofbaar zijn in de vorm waarin zij in de handel worden gebracht. Eén waarschuwingszin is verplicht en de keuze ervan wordt bepaald aan de hand van het onderstaande :

R2 Ontploffingsgevaar door schok, wrijving, vuur of andere ontstekingsoorzaken

- stoffen en preparaten, met uitzondering van de hieronder genoemde.

R3 Ernstig ontploffingsgevaar door schok, wrijving, vuur of andere ontstekingsoorzaken

- bijzonder gevoelige stoffen en preparaten zoals zouten van pikrinezuur of PETN.

#### 2.2.2. Oxiderend

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als oxiderend en gekenmerkt met het symbool "O" en de gevaarsaanduiding "oxiderend" overeenkomstig de resultaten van de tests van bijlage V. Eén waarschuwingszin is verplicht en de keuze ervan wordt bepaald aan de hand van de testresultaten, rekening houdend met het onderstaande :

R7 Kan brand veroorzaken

- organische peroxiden, die ook zonder in contact te komen met andere brandbare stoffen ontvlambare eigenschappen hebben.

R8 Bevordert de ontbranding van brandbare stoffen

- andere oxiderende stoffen en preparaten, inclusief anorganische peroxiden, die bij contact met brandbaar materiaal brand kunnen veroorzaken of de kans op brand kunnen verhogen.

R9 Ontploffingsgevaar bij menging met brandbare stoffen

- andere stoffen en preparaten, inclusief anorganische peroxiden, die ontplofbaar worden na menging met brandbaar materiaal, bijvoorbeeld bepaalde chloraten.

##### 2.2.2.1. *Opmerkingen betreffende peroxiden*

Wat het ontploffingsgevaar betreft, wordt een organisch peroxide of een preparaat daarvan in de vorm waarin het op de markt wordt gebracht, ingedeeld aan de hand van de onder punt 2.2.1 genoemde criteria, op basis van tests die worden uitgevoerd overeenkomstig de in bijlage V uiteengezette methoden.

Wat de oxiderende eigenschappen betreft, mogen de bestaande methoden van bijlage V niet op organische peroxiden worden toegepast.

Als het gaat om stoffen, worden organische peroxiden die nog niet als ontplofbaar zijn ingedeeld, als gevaarlijk ingedeeld op basis van hun structuur (bijvoorbeeld R-O-O-H of R<sub>1</sub>-O-O-R<sub>2</sub>).

Preparaten die nog niet als ontplofbaar zijn ingedeeld, worden ingedeeld aan de hand van de in punt 9.5 besproken berekeningsmethode die is gebaseerd op het percentage actieve zuurstof.

Een organisch peroxide of een preparaat daarvan dat nog niet als ontplofbaar is ingedeeld, wordt als oxiderend ingedeeld wanneer het peroxide of zijn formulering

- meer dan 5 % organische peroxiden bevat, of
- meer dan 0,5 % beschikbare zuurstof uit organische peroxiden en meer dan 5 % waterstofperoxide bevat.

### 2.2.3. Zeer licht ontvlambaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als zeer licht ontvlambaar en gekenmerkt met het symbool "F+" en de gevaarsaanduiding "zeer licht ontvlambaar" overeenkomstig de resultaten van de tests van bijlage V. De waarschuwingzin wordt toegekend volgens de volgende criteria :

#### R12 Zeer licht ontvlambaar

- vloeibare stoffen en preparaten met een vlampunt lager dan 0 °C en een kookpunt (of het beginpunt van een kooktraject) gelijk aan of lager dan 35 °C;
- gasvormige stoffen en preparaten die bij normale temperatuur en druk aan de lucht blootgesteld kunnen ontbranden.

### 2.2.4. Licht ontvlambaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als licht ontvlambaar en gekenmerkt met het symbool "F" en de gevaarsaanduiding "licht ontvlambaar" overeenkomstig de resultaten van de tests van bijlage V. Waarschuwingzinnen worden toegekend volgens de volgende criteria :

#### R11 Licht ontvlambaar

- vaste stoffen en preparaten die na kortstondig contact met een ontstekingsbron gemakkelijk kunnen ontbranden en die na verwijdering van de ontstekingsbron blijven branden of gloeien;
- vloeibare stoffen en preparaten met een vlampunt beneden 21 °C, die echter niet zeer licht ontvlambaar zijn.

#### R15 Vormt zeer licht ontvlambaar gas in contact met water

- stoffen en preparaten die in contact met water of vochtige lucht een gevaarlijke hoeveelheid zeer licht ontvlambaar gas ontwikkelen met een minimumsnelheid van 1 l/kg/h.

#### R17 Spontaan ontvlambaar in lucht

- stoffen en preparaten die zonder toevoer van energie bij normale temperatuur aan de lucht, in temperatuur kunnen stijgen en ten slotte kunnen ontbranden.

### 2.2.5. Ontvlambaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als ontvlambaar overeenkomstig de resultaten van de tests van bijlage V. De waarschuwingzin wordt toegekend volgens onderstaande criteria :

#### R10 Ontvlambaar

- vloeibare stoffen en preparaten met een vlampunt hoger dan of gelijk aan 21 °C en lager dan of gelijk aan 55 °C.

In de praktijk is echter gebleken dat preparaten met een vlampunt gelijk aan of hoger dan 21 °C en lager dan of gelijk aan 55 °C niet behoeven te worden ingedeeld als ontvlambaar indien deze preparaten op geen enkele wijze de verbranding kunnen onderhouden, evenwel alleen indien er geen reden is om gevaren te vrezen voor degenen die met deze preparaten omgaan of voor andere personen.

### 2.2.6. Andere fysisch-chemische eigenschappen

Aan de stoffen en preparaten die op grond van de punten 2.2.1 tot en met 2.2.5 of de hoofdstukken 3, 4 en 5 zijn ingedeeld, worden aanvullende waarschuwingzinnen toegekend overeenkomstig de volgende criteria (gebaseerd op ervaring verkregen bij het samenstellen van bijlage I) :

#### R1 In droge toestand ontplofbaar

Ontplofbare stoffen en preparaten die als oplossing of in vochtige toestand in de handel worden gebracht; bijvoorbeeld nitrocellulose met meer dan 12,6 % stikstof.

#### R4 Vormt met metalen zeer gemakkelijk ontplofbare verbindingen

Stoffen en preparaten die gevoelige ontplofbare metaalverbindingen kunnen vormen; bijvoorbeeld pikrinezuur, styfninezuur.

#### R5 Ontploffingsgevaar door verwarming

Stoffen en preparaten die niet bestand zijn tegen warmte en niet zijn ingedeeld als ontplofbaar; bijvoorbeeld perchloorzuur in concentratie groter dan 50 %.

#### R6 Ontplofbaar met en zonder lucht

Stoffen en preparaten die bij kamertemperatuur niet stabiel zijn; bijvoorbeeld acetyleen.

#### R7 Kan brand veroorzaken

Reactieve stoffen en preparaten; bijvoorbeeld fluor, natriumdithioniet.

#### R14 Reageert heftig met water

Stoffen en preparaten die heftig met water reageren; bijvoorbeeld acetylchloride, alkalimetalen, titaantetrachloride.

#### R16 Ontploffingsgevaar bij menging met oxiderende stoffen

Stoffen en preparaten die explosief reageren met oxidatiemiddelen; bijvoorbeeld rode fosfor.

#### R18 Kan bij gebruik een ontvlambaar/ontplofbaar damp-luchtmengsel vormen

Preparaten die zelf niet als ontvlambaar zijn ingedeeld maar die aan de lucht ontvlambare vluchtige bestanddelen bevatten.

#### R19 Kan ontplofbare peroxiden vormen

Stoffen en preparaten die tijdens opslag peroxiden kunnen vormen; bijvoorbeeld diëthylether, 1,4-dioxaan.

#### R30 Kan bij gebruik licht ontvlambaar worden

Preparaten, als zodanig niet als ontvlambaar ingedeeld, die echter door het ontsnappen van niet-ontvlambare vluchtige bestanddelen ontvlambaar kunnen worden.

#### R44 Ontploffingsgevaar bij verwarming in afgesloten toestand

Stoffen en preparaten, als zodanig volgens 2.2.1 niet als ontplofbaar ingedeeld, die echter in de praktijk bij verhitting in voldoende afgesloten toestand explosief gedrag kunnen vertonen. Zo zullen bepaalde stoffen die bij verhitting in een stalen vat explosief ontleden, dit in een minder stevige verpakking niet doen.

Zie voor andere aanvullende waarschuwingzinnen punt 3.2.8.

### 3. INDELING OP BASIS VAN TOXICOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN

#### 3.1. Inleiding

3.1.1. De indeling heeft zowel betrekking op de acute als op de chronische effecten van stoffen en preparaten hetzij als gevolg van een enkele blootstelling hetzij als gevolg van een herhaalde of langdurige blootstelling.

Wanneer door epidemiologisch onderzoek, door wetenschappelijk gefundeerde casestudies als omschreven in deze bijlage of door statistisch onderbouwde ervaring, bijvoorbeeld door analyse van gegevens afkomstig van gifcentra of betreffende beroepsziekten, kan worden aangetoond dat de toxicologische effecten bij de mens anders zijn dan op grond van de toepassing van de in punt 1.6 van deze bijlage omschreven methoden te verwachten is, dan wordt de stof of het preparaat ingedeeld op basis van de effecten ervan op de mens. Proeven op mensen dienen echter te worden ontmoedigd en mogen normalerwijze niet worden gebruikt om positieve gegevens op grond van dierproeven te ontkrachten.

Het KB van 14 november 1993 gewijzigd door het KB van 15 mei 2001 beoogt de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. Voor verschillende eindpunten bevat bijlage V van dit besluit gevalideerde in vitro testmethoden, en deze tests dienen waar passend te worden gebruikt.

3.1.2. Stoffen worden op basis van de beschikbare experimentele gegevens ingedeeld overeenkomstig de volgende criteria waarbij rekening wordt gehouden met de belangrijkheid van deze effecten :

(a) voor acute toxiciteit (letale en onherstelbare effecten na een enkele blootstelling) moeten de criteria van de punten 3.2.1 tot en met 3.2.3 worden gebruikt;

(b) voor subacute, subchronische of chronische toxiciteit moeten de criteria van de punten 3.2.2 tot en met 3.2.4 worden gebruikt;

(c) voor bijtende en irriterende effecten moeten de criteria van de punten 3.2.5 en 3.2.6 worden gebruikt;

(d) voor overgevoelgeheffecten moeten de criteria van punt 3.2.7 worden gebruikt;

(e) voor bepaalde bijzondere effecten op de gezondheid (kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige effecten) moeten de criteria in hoofdstuk 4 worden gebruikt.

3.1.3. Voor preparaten geschiedt de indeling wat gevaren voor de gezondheid betreft :

(a) op basis van een in artikel 5, § 2 en bijlage I deel B van het KB van 11 januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode indien experimentele gegevens ontbreken. In dit geval is de indeling gebaseerd op de afzonderlijke concentratiegrenzen die worden vermeld in :

— bijlage I van dit besluit, of

— bijlage I, deel B, deel 2 van het KB van 11 januari 1993 wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I van dit besluit voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder bijbehorende concentratiegrenzen;

(b) of, wanneer experimentele gegevens wel beschikbaar zijn, op basis van de criteria van punt 3.1.2, met uitzondering van de in 3.1.2, onder e), genoemde kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige eigenschappen, die met een in artikel 5, § 2 en bijlage I deel B, deel 1.7 tot en met 1.9 en 2.6 van het KB van 11 januari 1993, bedoelde gebruikelijke methode moeten worden beoordeeld.

Nota : Onverminderd de voorschriften van het KB van 28 februari 1994 mogen de in punt 3.1.3, onder b), bedoelde methoden uitsluitend worden toegepast indien de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van het preparaat wetenschappelijk kan aantonen dat de toxicologische eigenschappen van het preparaat niet correct kunnen worden bepaald met de in punt 3.1.3, onder a), bedoelde methode, of op basis van de bestaande testresultaten bij dieren; de toepassing ervan dient te worden gemotiveerd of uitdrukkelijk te worden toegestaan overeenkomstig artikel 3 van het KB van 14 november 1993 gewijzigd door het KB van 15 mei 2001.

Ongeacht de methode die voor de beoordeling van het gevaar van een preparaat wordt gebruikt, moeten alle in bijlage I, deel B, deel 2 van het KB van 11 januari 1993 genoemde voor de gezondheid gevaarlijke effecten in beschouwing worden genomen.

3.1.4. Wanneer de indeling dient te geschieden aan de hand van de resultaten van dierproeven, dan moeten de resultaten van de proeven een juiste weerspiegeling vormen van de gevaren voor de mens, willen deze resultaten voor de mens geldig zijn.

3.1.5. De acute orale toxiciteit van een in de handel gebrachte stof of in de handel gebracht preparaat kan worden vastgesteld aan de hand van een LD<sub>50</sub>-test dan wel door bepaling van de discriminerende dosis (vaste-dosismethode) of door bepaling van het blootstellingsbereik waarbinnen een letaal effect voorspeld wordt (bepaling van de acute-toxiciteitsklasse).

3.1.5.1. De discriminerende dosis is de dosis die evidente toxiciteit maar niet de dood veroorzaakt. Het moet een van de vier dosisniveaus zijn die in bijlage V worden gespecificeerd (5, 50, 500 of 2000 mg per kg lichaamsgewicht).

Het begrip "evidente toxiciteit" wordt gebruikt om toxische effecten na toediening van de teststof aan te duiden die zo ernstig zijn dat blootstelling aan het volgende hogere vaste-dosisniveau waarschijnlijk de dood tot gevolg heeft.

Bij de vaste-dosismethode zijn de mogelijke testresultaten bij een bepaalde dosis :

— minder dan 100 % overlevende dieren;

— 100 % overlevende dieren, doch evidente intoxicatie;

— 100 % overlevende dieren, geen evidente intoxicatie.

Bij de criteria in de punten 3.2.1, 3.2.2 en 3.2.3 wordt alleen het eindresultaat vermeld. De dosis van 2 000 mg/kg dient in eerste instantie te worden gebruikt om informatie te verkrijgen over de toxische effecten van stoffen met een lage acute toxiciteit die niet op basis van acute toxiciteit zijn ingedeeld.

Bij de vaste-dosismethode kan het, als niet eerder op het geschikte dosisniveau is getest, in bepaalde gevallen noodzakelijk zijn bij hogere of lagere dosisniveaus te testen. Raadpleeg ook de evaluatietabel bij testmethode B.1 bis van bijlage V.

3.1.5.2. Bij de bepaling van de acute-toxiciteitsklasse wordt het blootstellingsbereik waarbinnen letale effecten worden voorspeld, afgeleid uit waarnemingen van het al dan niet optreden van aan de stof toe te schrijven mortaliteit. Voor de eerste test wordt één van drie vaste initiële doses (25, 200 of 2 000 mg per kg lichaamsgewicht) gebruikt.

Bij de bepaling van de acute-toxiciteitsklassetestmethode kan het, als niet eerder op het geschikte dosisniveau is getest, in bepaalde gevallen noodzakelijk zijn bij hogere of lagere dosisniveaus te testen. Raadpleeg ook de stroomdiagrammen betreffende de procedure bij testmethode B.1 ter van bijlage V.

### 3.2. Criteria voor de indeling, keuze van symbolen, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingszinnen

#### 3.2.1. Zeer vergiftig

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als zeer vergiftig en gekenmerkt met het symbool "T+" en de gevaarsaanduiding "zeer vergiftig" overeenkomstig de hieronder weergegeven criteria.

Waarschuwingszinnen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R28 Zeer vergiftig bij opname door de mond

Resultaten acute toxiciteit :

— LD<sub>50</sub>, oraal, rat : ≤ 25 mg/kg;

— vaste-dosismethode, oraal, rat, 5 mg/kg : minder dan 100 % overlevende dieren;

— hoge mortaliteit bij doses ≤ 25 mg/kg oraal, rat, methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (voor de interpretatie van de testresultaten, zie de stroomdiagrammen in aanhangsel 2 van testmethode B.1 ter van bijlage V).

R27 Zeer vergiftig bij aanraking met de huid

Resultaten acute toxiciteit :

— LD<sub>50</sub>, dermaal, rat of konijn : ≤ 50 mg/kg.

R26 Zeer vergiftig bij inademing

Resultaten acute toxiciteit :

— LC<sub>50</sub>, inhalatoir, rat, voor aërosolen of deeltjes : ≤ 0,25 mg/l/4 uur,

— LC<sub>50</sub>, inhalatoir, rat, voor gassen en dampen : ≤ 0,5 mg/l/4 uur.

R39 Gevaar voor ernstige onherstelbare effecten

— Sterke aanwijzingen dat een eenmalige blootstelling via een passende weg, doorgaans in het bovengenoemde dosisinterval, waarschijnlijk leidt tot onherstelbare schade welke verschilt van de in hoofdstuk 4 bedoelde effecten.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven, moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/26/28, R39/27/28, R39/26/27/28.

#### 3.2.2. Vergiftig

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als vergiftig en gekenmerkt met het symbool "T" en de gevaarsaanduiding "vergiftig" overeenkomstig de hieronder weergegeven criteria. Waarschuwingszinnen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R25 Vergiftig bij opname door de mond

Resultaten acute toxiciteit :

— LD<sub>50</sub>, oraal, rat : 25 < LD<sub>50</sub> ≤ 200 mg/kg;

— discriminerende dosis, oraal, rat, 5 mg/kg : 100 % overlevende dieren, doch evidente toxiciteit; of

— hoge mortaliteit in het dosisinterval > 25 tot ≤ 200 mg/kg, oraal, rat, methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (voor de interpretatie van de testresultaten, zie de stroomdiagrammen in aanhangsel 2 van testmethode B.1 ter van bijlage V).

R24 Vergiftig bij aanraking met de huid

Resultaten acute toxiciteit :

— LD<sub>50</sub>, dermaal, rat of konijn : 50mg/kg < LD<sub>50</sub> ≤ 400 mg/kg.

R23 Vergiftig bij inademing

Resultaten acute toxiciteit :

— LC<sub>50</sub>, inhalatoir, rat, voor aërosolen of deeltjes : 0,25 < LC<sub>50</sub> ≤ 1 mg/l/4 uur,

— LC<sub>50</sub>, inhalatoir, rat, voor gassen en dampen : 0,5 < LC<sub>50</sub> ≤ 2 mg/l/4 uur.

R39 Gevaar voor ernstige onherstelbare effecten

— Sterke aanwijzingen dat een eenmalige blootstelling via een passende weg, doorgaans in het bovengenoemde dosisinterval, waarschijnlijk leidt tot onherstelbare schade welke verschilt van de in hoofdstuk 4 bedoelde effecten.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven, moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R39/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

R48 Gevaar voor ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling

— waarschijnlijk wordt ernstige schade (duidelijke functieverstoring of morfologische verandering met toxicologische betekenis) veroorzaakt door herhaalde of langdurige blootstelling via een passende weg.

Stoffen en preparaten worden ten minste als toxisch ingedeeld wanneer deze effecten worden waargenomen bij doses van een grootteorde (dit wil zeggen het tienvoudige) minder dan die welke in punt 3.2.3 voor R48 worden genoemd.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven, moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/23/25, R48/24/25, R48/23/24/25.

#### 3.2.3. Schadelijk

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als schadelijk en gekenmerkt met het symbool "Xn" en de gevaarsaanduiding "schadelijk" overeenkomstig de hieronder weergegeven criteria. Waarschuwingszinnen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R22 Schadelijk bij opname door de mond

Resultaten acute toxiciteit :

— LD<sub>50</sub>, oraal, rat : 200 mg/kg < LD<sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg;

— discriminerende dosis, oraal, rat, 50 mg/kg : 100 % overlevende dieren maar evidente toxiciteit;

— minder dan 100 % overlevende dieren bij 500 mg/kg oraal, rat, vaste-dosismethode. Raadpleeg de evaluatietabel bij testmethode B.1 bis van bijlage V; of

— hoge mortaliteit in het dosisinterval > 200 tot ≤ 2 000 mg/kg, oraal, rat, methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (voor de interpretatie van de testresultaten, zie de stroomdiagrammen in bijlage 2 van testmethode B.1 ter van bijlage V).



R21 Schadelijk bij aanraking met de huid

Resultaten acute toxiciteit :

— LD<sub>50</sub>, dermaal, rat of konijn : 400 mg/kg < LD<sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg.

R20 Schadelijk bij inademing

Resultaten acute toxiciteit :

— LC<sub>50</sub>, inhalatoir, rat, voor aërosolen of deeltjes : 1 < LC<sub>50</sub> ≤ 5 mg/l/4 uur;

— LC<sub>50</sub>, inhalatoir, rat, voor gassen of dampen : 2 < LC<sub>50</sub> ≤ 20 mg/l/4 uur.

R65 schadelijk : kan longschade veroorzaken na verslikken

Vloeibare stoffen en preparaten die voor de mens vanwege hun lage viscositeit een gevaar bij inslikken opleveren :

(a) Stoffen en preparaten die alifatische, alicyclische en aromatische koolwaterstoffen in een totale concentratie van ten minste 10 % bevatten en die

— hetzij een doorstroomtijd van minder dan 30 s in een 3 mm ISO-beker overeenkomstig ISO-norm 2431 hebben (ISO 2431, editie van april 1996 / juli 1999, inzake Paints and varnishes - Determination of flow time by use of flow cups'),

— hetzij een kinematische viscositeit, gemeten met een gekalibreerde glazen capillaire viscosimeter volgens ISO-norm 3104/3105, van minder dan  $7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  bij 40 °C hebben (ISO 3104, editie 1994, inzake « Petroleum products - Transparent and opaque liquids - Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity »; ISO 3105, editie 1994, inzake « Glass capillary kinematic viscometers - Specifications and operating instructions »),

— hetzij een kinematische viscositeit, gemeten met een rotatieviscosimeter volgens ISO-norm 3219, van minder dan  $7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  bij 40 °C hebben (ISO 3219, editie 1993, inzake « Plastics — Polymers/resins in the liquid state or as emulsions or dispersions - Determination of viscosity using a rotational viscometer with defined shear rate »).

Merk op dat stoffen en preparaten die aan bovengenoemde criteria voldoen niet als schadelijk behoeven te worden ingedeeld als hun gemiddelde oppervlaktespanning groter is dan 33 mN/m bij 25 °C als gemeten met de du Nouy-tensiometer of volgens de in bijlage V, Deel A.5, uiteengezette testmethoden.

(b) Andere stoffen en preparaten op basis van praktijkervaring bij de mens.

R68 Onherstelbare effecten zijn niet uitgesloten

— Sterke aanwijzingen dat een éénmalige blootstelling via een passende weg, doorgaans in het bovengenoemde dosisinterval, waarschijnlijk leidt tot onherstelbare schade, welke verschilt van de in hoofdstuk 4 bedoelde effecten.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven moet een van de volgende combinaties worden gebruikt : R68/20, R68/21, R68/22, R68/20/21, R68/20/22, R68/21/22, R68/20/21/22.

R48 Gevaar voor ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling

— Waarschijnlijk wordt ernstige schade (duidelijke functieverstoring of morfologische verandering met toxicologische betekenis) veroorzaakt door langdurige of herhaalde blootstelling via een passende weg.

Stoffen en preparaten worden ten minste als schadelijk ingedeeld wanneer deze effecten worden waargenomen bij de volgende doses :

— oraal, rat, ≤ 50 mg/kg (lichaamsgewicht)/dag,

— dermaal, rat of konijn, ≤ 100 mg/kg (lichaamsgewicht)/dag,

— inhalatoir, rat, ≤ 0,25 mg/l, 6 uur/dag.

Deze richtwaarden zijn zonder meer van toepassing wanneer ernstige beschadigingen zijn waargenomen in een subchronische toxiciteitsproef (90 dagen). Bij de interpretatie van de resultaten van een subacute toxiciteitsproef (28 dagen) moeten deze getallen met ongeveer een factor drie worden verhoogd. Wanneer de resultaten van een chronische toxiciteitsproef (2 jaar) beschikbaar zijn, dan dienen deze per geval te worden beoordeeld. Indien resultaten van studies die meer dan één termijn bestrijken beschikbaar zijn, dient men in de regel de resultaten van de langste studie te gebruiken.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven moet een van de volgende combinaties worden gebruikt : R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

### 3.2.3.1. Opmerkingen met betrekking tot vluchtige stoffen

Bij bepaalde stoffen met een hoge verzadigde dampconcentratie kunnen er aanwijzingen zijn voor effecten die reden tot bezorgdheid geven. Het is mogelijk dat dergelijke stoffen niet worden ingedeeld op grond van de in deze handleiding genoemde criteria voor effecten op de gezondheid (3.2.3) en niet onder punt 3.2.8 vallen. Wanneer er echter afdoende aanwijzingen bestaan dat deze stoffen bij normaal gebruik risico's opleveren, kan het nodig zijn ze per geval in te delen in bijlage I.

### 3.2.4. Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van R48

Het gebruik van deze waarschuwingzin heeft betrekking op het specifieke gamma van biologische effecten die hieronder staan omschreven. Bij gebruik van deze waarschuwingzin wordt onder ernstige schade aan de gezondheid onder meer de dood en duidelijke functieverstoring of morfologische verandering met toxicologische betekenis verstaan. Het is vooral belangrijk wanneer deze veranderingen onherstelbaar zijn. Het is eveneens van belang niet alleen bepaalde ernstige veranderingen in een enkel orgaanstelsel of biologisch systeem in beschouwing te nemen, maar ook minder specifieke veranderingen van minder ernstige aard die betrekking hebben op verscheidene organen of drastische veranderingen in de algehele gezondheidstoestand.

Bij het beoordelen van de vraag of er sprake is van dit soort effecten dienen de volgende richtsnoeren te worden geraadpleegd :

1. aanwijzingen waaruit blijkt dat R48 moet worden toegepast :

(a) met de stof verband houdende sterfgevallen;

(b) (i) belangrijke functionele veranderingen in het centrale of perifere zenuwstelsel, inclusief gezichtsvermogen, gehoor en reukvermogen, beoordeeld aan de hand van klinische waarnemingen of andere geschikte methoden (bijvoorbeeld elektrofysiologie);

(ii) belangrijke functionele veranderingen in andere orgaanstelsels (bijvoorbeeld de long);

(c) elke consistente verandering in de klinische biochemische, hematologische of urineanalytische parameters die duiden op een ernstige orgaanstoornis. Hematologische stoornissen worden als uitzonderlijk belangrijk gezien wanneer aanwijzingen doen vermoeden dat zij het gevolg zijn van een verminderde productie van bloedcellen in het beenmerg;

(d) bij microscopisch onderzoek na autopsie vastgestelde ernstige orgaanbeschadigingen :

(i) wijdverspreide of ernstige necrose, fibrose of granuloomvorming in vitale organen met regeneratief vermogen (bijvoorbeeld de lever);

(ii) grote morfologische veranderingen die potentieel omkeerbaar zijn maar duidelijk op een uitgesproken orgaanstoornis wijzen (bijvoorbeeld ernstige vervetting van de lever, ernstige acute tubulaire nefrose in de nier, ulcererende gastritis); of

(iii) aanwijzingen voor aanzienlijke celdood in vitale organen die niet tot regeneratie in staat zijn (bijvoorbeeld fibrose van het myocardium of het afsterven van een zenuw) of in stamcelpopulaties (bijvoorbeeld aplasie of hypoplasie van het beenmerg).

Bovengenoemd bewijs zal doorgaans worden verkregen uit dierproeven. Wanneer aan praktijkervaring ontleende gegevens in beschouwing worden genomen, dient speciale aandacht te worden geschonken aan de blootstellingsniveaus;

2. aanwijzingen waaruit blijkt dat R48 niet moet worden toegepast :

Het gebruik van deze waarschuwingzin is beperkt tot "ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling". Bij zowel mensen als dieren kunnen een aantal met de stof verband houdende effecten worden waargenomen die het gebruik van R48 niet rechtvaardigen. Deze effecten zijn van belang wanneer wordt geprobeerd om voor een chemische stof een "no-effect"-niveau vast te stellen. Voorbeelden van goed gedocumenteerde veranderingen die, ongeacht hun statistische significantie, normaal gesproken toekenning van R48 niet rechtvaardigen zijn :

(a) klinische waarnemingen of veranderingen in gewichtstoename, voedselconsumptie of waterinname, die een geringe toxicologische betekenis kunnen hebben maar op zichzelf geen "ernstige schade" impliceren;

(b) kleine veranderingen in de klinische biochemische, hematologische of urineanalytische parameters die van twijfelachtige of minimale toxicologische betekenis zijn;

(c) veranderingen in orgaangewichten zonder aanwijzingen voor orgaanstoornissen;

(d) adaptieve reacties (bijvoorbeeld macrofaagmigratie in de long, leverhypertrofie en enzyminductie, hyperplastische reacties op irriterende stoffen); plaatselijke effecten op de huid als gevolg van herhaalde dermale toediening van een stof die beter zouden worden gekenmerkt met R38 "Irriterend voor de huid"; of

(e) waar een soortspecifiek toxiciteitsmechanisme (bijvoorbeeld via specifieke stofwisselingsroutes) is aangetoond.

### 3.2.5. Bijtend

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als bijtend en gekenmerkt met het symbool "C" en de gevaarsaanduiding "bjtend" overeenkomstig de onderstaande criteria :

— een stof of preparaat wordt als bijtend aangemerkt indien deze stof of dit preparaat, aangebracht op de gezonde en ongeschonden huid van een proefdier, het huidweefsel van ten minste één dier over de volledige dikte aantast in de in bijlage V genoemde huidirritatietest of in een gelijkwaardige test.

— de indeling kan worden gebaseerd op de resultaten van gevalideerde in vitro testen, bijvoorbeeld die welke in bijlage V wordt genoemd (B.40. Huidcorrosie : bepaling van de transcutane elektrische weerstand van rattenhuid en bepaling met behulp van een model van de menselijke huid.)

— Een stof of preparaat dient ook als bijtend te worden aangemerkt indien het resultaat bijvoorbeeld op grond van sterk zure of basische reacties te voorspellen is (pH moet 2 of kleiner c.q. 11,5 of groter zijn). Indien de extreme pH-waarde de basis vormt van de indeling kan ook rekening worden gehouden met de potentiële zuur- of basecapaciteit <sup>(1)</sup>. Indien op basis van de potentiële zuur- of basecapaciteit wordt vermoed dat de stof of het preparaat niet bijtend is, dient ter bevestiging een test - bij voorkeur een passende gevalideerde in vitro test - te worden uitgevoerd. De potentiële zuur- of basecapaciteit kan niet als enig argument worden gebruikt om een stof of preparaat niet als bijtend in te delen.

Waarschuwingzinnen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

#### R35 Veroorzaakt ernstige brandwonden

— Indien, na aanbrengen op de gezonde en ongeschonden huid van een proefdier en blootstelling gedurende ten hoogste 3 minuten, het huidweefsel over de volledige dikte wordt aangetast, of indien een dergelijk resultaat voorspelbaar is.

#### R34 Veroorzaakt brandwonden

— indien, na aanbrengen op de gezonde en ongeschonden huid van een proefdier en blootstelling gedurende ten hoogste 4 uur, het huidweefsel over de volledige dikte wordt aangetast, of indien een dergelijk resultaat voorspelbaar is;

— Organische waterstofperoxiden, behalve wanneer het tegendeel kan worden bewezen.

#### Aantekeningen

Indien de indeling wordt gebaseerd op de resultaten van een gevalideerde in vitro test, moet R35 of R34 worden toegekend overeenkomstig het vermogen van de testmethode om een onderscheid te maken tussen beide uitspraken.

Indien de indeling uitsluitend op de extreme pH-waarde wordt gebaseerd, moet R35 worden toegekend.

Nota's

<sup>(1)</sup> J.R. Young, M.J. How, A.P. Walker and W.M.H. Worth (1988) « Classification as corrosive or irritant to skin of preparations containing acidic or alkaline substances, without testing on animals » Toxic. In Vitro 2(1) : blz. 19-26.



### 3.2.6. Irriterend

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als irriterend en gekenmerkt met het symbool "Xi" en de gevaarsaanduiding "irriterend" overeenkomstig de onderstaande criteria.

#### 3.2.6.1 Huidontsteking

De volgende waarschuwingzin wordt toegekend overeenkomstig de aangegeven criteria :

##### R38 Irriterend voor de huid

— Stoffen en preparaten die een significante huidontsteking veroorzaken die 24 uur of langer aanhoudt na blootstelling gedurende ten hoogste 4 uur bij konijnen volgens de huidirritatietest van bijlage V.

Een huidontsteking is significant als :

(a) de gemiddelde waarde van de uitslag voor de vorming van erytheem en eschara of de vorming van oedeem, berekend over alle geteste dieren, 2 of hoger is, of

(b) indien de test van bijlage V is uitgevoerd op drie dieren, bij ten minste twee daarvan een gemiddelde waarde van 2 of meer, berekend voor elk dier afzonderlijk, voor de vorming van erytheem en eschara of voor de vorming van oedeem is waargenomen.

In beide gevallen moeten alle uitslagen van een effect bij elke afleestijd (24, 48 en 72 uur) worden gebruikt voor de berekening van de betreffende gemiddelde waarden.

Een huidontsteking is eveneens significant indien zij bij ten minste twee dieren aan het einde van de observatieperiode aanhoudt. Met bijzondere effecten zoals hyperplasie, schilfering, verkleuring, kloven, korsten en alopecia moet rekening worden gehouden.

Relevante gegevens kunnen ook worden verkregen uit niet-acute dierstudies (zie de opmerkingen bij R48, punt 2, onder d)). Deze worden significant geacht indien de waargenomen effecten vergelijkbaar zijn met bovengenoemde;

— Stoffen en preparaten die blijkens praktijkwaarnemingen bij de mens bij onmiddellijk, langdurig of herhaald contact significante huidontsteking veroorzaken;

— Organische peroxiden, behalve wanneer het tegendeel kan worden bewezen.

Paresthesie :

Paresthesie bij de mens, veroorzaakt door contact van de huid met pyrethroïde bestrijdingsmiddelen, wordt niet beschouwd als een irriterend effect waardoor indeling als Xi/R38 gerechtvaardigd is. Wel moet S-zin S24 worden gebruikt voor stoffen die dit effect blijken te hebben.

#### 3.2.6.2. Oogbeschadigingen/Oogontstekingen

De volgende waarschuwingzinnen worden eveneens toegekend volgens de gegeven criteria :

##### R36 Irriterend voor de ogen

— Stoffen en preparaten die na aanbrengen in het oog van het dier beduidende oogbeschadigingen en/of ontstekingen veroorzaken die binnen 72 uur na de blootstelling optreden en ten minste 24 uur aanhouden.

Oogbeschadigingen en/of oogontstekingen zijn beduidend indien de gemiddelden van de oogirritatietest van bijlage V een van de volgende waarden hebben :

— opaciteit hoornvlies gelijk aan of groter dan 2 maar kleiner dan 3;

— beschadiging iris gelijk aan of groter dan 1 maar niet groter dan 1,5;

— roodheid van de bindvliesen gelijk aan of groter dan 2,5;

— oedeem van de bindvliesen (chemosis) gelijk aan of groter dan 2;

of, wanneer de test van bijlage V is uitgevoerd op drie dieren, indien bij ten minste twee daarvan de beschadigingen gelijk zijn aan een van de bovenstaande waarden, behalve dat voor beschadiging van de iris de waarde gelijk aan of groter dan 1 doch kleiner dan 2 moet zijn en voor roodheid van de bindvliesen de waarde 2,5 of hoger moet zijn.

In beide gevallen moeten alle uitslagen van een effect bij elke afleestijd (24, 48 en 72 uur) worden gebruikt voor de berekening van de desbetreffende gemiddelde waarden;

— Stoffen en preparaten die blijkens praktijkwaarnemingen bij de mens beduidende oogbeschadigingen en/of oogontstekingen veroorzaken;

— Organische peroxiden, behalve wanneer het tegendeel kan worden bewezen.

##### R41 Gevaar voor ernstig oogletsel

— stoffen en preparaten die na aanbrengen in het oog van het dier ernstige oogbeschadigingen en/of ontstekingen veroorzaken die binnen 72 uur na de blootstelling optreden en ten minste 24 uur aanhouden.

Oogbeschadigingen en/of oogontstekingen zijn ernstig indien de gemiddelden van de oogirritatietest van bijlage V een van de volgende waarden hebben :

— opaciteit hoornvlies gelijk aan of groter dan 3;

— beschadiging iris groter dan 1,5.

Hetzelfde geldt als de test is uitgevoerd op drie dieren indien deze beschadigingen en/of ontstekingen bij ten minste twee dieren een van de volgende waarden hebben :

— opaciteit hoornvlies gelijk aan of groter dan 3;

— beschadiging iris gelijk aan 2.

In beide gevallen moeten alle uitslagen van een effect bij elke afleestijd (24, 48 en 72 uur) worden gebruikt voor de berekening van de desbetreffende gemiddelde waarden.

Oogbeschadigingen en/of -ontstekingen zijn eveneens ernstig indien zij tot het einde van de observatieperiode aanhouden.

Ten slotte zijn zij ernstig indien de stof of het preparaat een irreversibele kleuring van de ogen veroorzaakt;

— Stoffen en preparaten die blijkens praktijkwaarnemingen bij de mens ernstige oogbeschadigingen en/of oogontstekingen veroorzaken.

Aantekening

Indien een stof of preparaat als bijtend wordt ingedeeld en R34 of R35 krijgt toegekend, geldt het gevaar voor ernstig oogletsel impliciet en wordt R41 niet op het etiket vermeld.

### 3.2.6.3. Irriterend voor de ademhalingswegen

De volgende waarschuwingzin wordt toegekend overeenkomstig de aangegeven criteria :

#### R37 Irriterend voor de ademhalingswegen

Stoffen en preparaten die ernstige irritatie voor de ademhalingswegen veroorzaken, op grond van :

- waarnemingen bij de mens;
- positieve resultaten van geschikte dierproeven.

Opmerkingen in verband met het gebruik van R37

Bij de interpretatie van de waarnemingen bij de mens moet zorgvuldig een onderscheid worden gemaakt tussen effecten die leiden tot een indeling met waarschuwingzin R48 (zie punt 3.2.4) en effecten die leiden tot indeling met zin R37. Effecten die tot indeling met zin R37 leiden, zijn omkeerbaar en zijn doorgaans beperkt tot de bovenste luchtwegen.

Positieve resultaten van geschikte dierproeven kunnen gegevens omvatten die verkregen zijn met behulp van een algemene toxiciteitstest, met inbegrip van histopathologische gegevens met betrekking tot het ademhalingsstelsel. Om de irritatie van luchtwegen te evalueren mogen ook gegevens uit de meting van experimentele bradypnee worden gebruikt.

### 3.2.7 Sensibiliserend

#### 3.2.7.1 Overgevoeligheid bij inademing

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als sensibiliserend en gekenmerkt met het symbool "Xn", de gevaarsaanduiding "schadelijk" en de waarschuwingzin R42 overeenkomstig de onderstaande criteria :

#### R42 Kan overgevoeligheid veroorzaken bij inademing

- indien er gegevens zijn dat de stoffen of preparaten door inademing specifieke overgevoeligheidsreacties kunnen veroorzaken;
- indien er positieve resultaten zijn van geschikte dierproeven; of
- indien de stof een isocyanaat is, tenzij bewezen is dat het isocyanaat in kwestie bij inademing geen overgevoeligheid veroorzaakt.

Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van R42

Gegevens bij de mens

Gegevens dat een stof of preparaat door inademing specifieke overgevoeligheidsreacties kan veroorzaken, zullen normaal gebaseerd zijn op waarnemingen bij de mens. In deze context wordt bij overgevoeligheid doorgaans aan astma gedacht, maar ook andere overgevoeligheidsreacties, zoals rhinitis en alveolitis, moeten worden beschouwd. De conditie moet het klinisch karakter van een allergische reactie hebben. Immunologische mechanismen behoeven echter niet te worden aangetoond.

Bij de evaluatie van de gegevens met betrekking tot de blootstelling bij de mens moet, alvorens een beslissing wordt genomen inzake de indeling van de stof, ook rekening worden gehouden met :

- de omvang van de blootgestelde populatie;
- de mate van blootstelling.

Met bovengenoemde gegevens wordt bedoeld :

- klinische voorgeschiedenis en resultaten van geschikte longfunctieproeven met betrekking tot de blootstelling aan de stof, bevestigd door aanvullende bewijzen zoals :
  - een chemische structuur die verwant is aan de structuur van stoffen waarvan bekend is dat zij bij inademing overgevoeligheidsreacties veroorzaken;
  - in vivo immunologische proeven (bijv. huid priktest);
  - in vitro immunologische proeven (bijv. serologische analyse);
  - studies die wijzen op andere specifieke, maar niet-immunologische werkingsmechanismen, bijvoorbeeld herhaaldelijke beperkte irritatie, effecten van geneesmiddelen; of
  - resultaten van positieve bronchiale provocatieproeven met de stof, verricht overeenkomstig algemeen aanvaarde richtsnoeren voor de bepaling van specifieke overgevoeligheidsreacties.

De klinische voorgeschiedenis moet zowel het medische als het beroepsverleden omvatten, zodat het verband kan worden vastgesteld tussen de blootstelling aan een specifieke stof of preparaat en het ontstaan van overgevoeligheid bij inademing. Tot de relevante informatie behoren eveneens verergerende factoren thuis en op het werk, het begin en het verloop van de ziekte, familiale voorgeschiedenis en medische voorgeschiedenis van de patiënt. In de medische voorgeschiedenis moet ook worden vermeld of er in de kinderjaren andere allergische reacties of aandoeningen van de luchtwegen zijn voorgekomen en of men roker is (geweest).

De resultaten van positieve bronchiale provocatieproeven worden op zich als voldoende bewijs voor de indeling beschouwd. In de praktijk zullen echter reeds een groot aantal van bovengenoemde testen zijn verricht.

Aan stoffen die slechts bij mensen met een bronchiale hyperreactiviteit door middel van irritatie symptomen van astma oproepen, hoeft geen R42-zin te worden toegekend.

Dierproeven

Tot de gegevens van tests die indicatief zijn voor mogelijke overgevoeligheidsreacties op inademing van een stof of preparaat bij de mens behoren de resultaten van :

- IgE-metingen (bijvoorbeeld bij muizen); of
- specifieke pulmonaire reacties bij cavia's.

### 3.2.7.2. *Overgevoeligheid bij contact met de huid*

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als sensibiliserend en gekenmerkt met het symbool "Xi", de gevaarsaanduiding "irriterend" en de waarschuwingzin R43 overeenkomstig de onderstaande criteria :

R43 Kan overgevoeligheid veroorzaken bij contact met de huid

— indien uit de praktijk blijkt dat de stoffen en preparaten bij een aanzienlijk aantal mensen via huidcontact een overgevoeligheidsreactie teweeg kunnen brengen; of

— op grond van positieve reacties bij proefdieren.

Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van R43

Gegevens bij de mens

De volgende gegevens (ervaring uit de praktijk) volstaan om een stof of preparaat in te delen met zin R43 :

— positieve resultaten van geschikte patch-tests, normaliter in meer dan één dermatologische kliniek, of

— epidemiologische studies waaruit blijkt dat de stof of het preparaat allergische contactdermatitis veroorzaakt. Situaties waarbij een groot deel van de blootgestelde personen karakteristieke symptomen vertoont moeten met bijzondere aandacht worden bekeken, zelfs wanneer het aantal gevallen klein is, of

— positieve resultaten van experimentele studies bij de mens (zie ook punt 3.1.1).

De volgende aanwijzingen volstaan om aan een stof zin R43 toe te kennen wanneer er ondersteunende gegevens zijn :

— geïsoleerde episodes van allergische contactdermatitis, of

— epidemiologische studies waarbij toeval, vertekening of verstrengeling van factoren niet met redelijke zekerheid kunnen worden uitgesloten.

Als ondersteunende gegevens kunnen gelden :

— resultaten van overeenkomstig de bestaande richtlijnen uitgevoerde dierproeven die niet geheel voldoen aan de in het hoofdstuk over dierproeven gegeven criteria, maar die de limiet voldoende benaderen om als betekenisvol te kunnen worden beschouwd, of

— niet met standaardmethoden verkregen gegevens, of

— geschikte structuur-activiteitsrelaties.

Dierproeven

Positieve resultaten van geschikte dierproeven zijn :

— bij toepassing van de in bijlage V opgenomen adjuvans-testmethode voor overgevoeligheid van de huid of van andere typen testmethoden die gebruik maken van een adjuvans wordt een respons van ten minste 30 % van de dieren als positief beschouwd;

— voor elke andere testmethode wordt een respons van ten minste 15 % van de dieren als positief beschouwd.

### 3.2.7.3. *Immunologische contacturticaria*

Sommige stoffen of preparaten die voldoen aan de criteria voor R42 kunnen daarenboven immunologische contacturticaria veroorzaken. In dat geval moet informatie betreffende contracturticaria worden aangegeven door gebruik van de passende S-zinnen, doorgaans S24 en S36/37, alsmede door opname van die informatie in het veiligheidsinformatieblad.

Met betrekking tot stoffen of preparaten waarvoor aanwijzingen bestaan dat ze immunologische contacturticaria veroorzaken, en welke niet voldoen aan de criteria voor toekenning van zin R42, moet toekenning van zin R43 worden overwogen.

Er is geen erkend diermodel beschikbaar ter identificatie van stoffen die immunologische contacturticaria veroorzaken. Een desbetreffende indeling zal doorgaans gebeuren op basis van gegevens bij de mens, en wel op soortgelijke wijze als in verband met overgevoeligheid bij contact met de huid (R43).

### 3.2.8. *Andere toxicologische eigenschappen*

Aan de stoffen en preparaten die op grond van de punten 2.2.1 tot en met 3.2.7 en/of hoofdstukken 4 en 5 zijn ingedeeld, worden aanvullende waarschuwingzinnen toegekend overeenkomstig de volgende criteria (gebaseerd op ervaring verkregen bij het samenstellen van bijlage I).

R29 Vormt vergiftig gas in contact met water

Stoffen en preparaten die in contact met water of vochtige lucht een mogelijkere gevaarlijke hoeveelheid vergiftig of zeer vergiftig gas ontwikkelen, bijvoorbeeld aluminiumfosfide en fosforpentasulfide.

R31 Vormt vergiftige gassen in contact met zuren

Stoffen en preparaten die met zuren reageren en daarbij een gevaarlijke hoeveelheid vergiftig gas ontwikkelen, bijvoorbeeld natriumhypochloriet en bariumpolysulfide. Voor stoffen die door het grote publiek worden gebruikt, is aanbeveling S50 ("Niet vermengen met... (aan te geven door de fabrikant)") beter geschikt.

R32 Vormt zeer vergiftige gassen in contact met zuren

Stoffen en preparaten die met zuren reageren en daarbij een gevaarlijke hoeveelheid zeer vergiftig gas ontwikkelen, bijvoorbeeld zouten van blauwzuur en natriumazide. Voor stoffen die door het grote publiek worden gebruikt, is aanbeveling S50 ("Niet vermengen met... (aan te geven door de fabrikant)") beter geschikt.

R33 Gevaar voor cumulatieve effecten

Stoffen en preparaten waarvoor accumulatie in het menselijk lichaam waarschijnlijk is en die aanleiding geven tot bezorgdheid die echter niet voldoende is om het gebruik van R48 te rechtvaardigen.

Zie voor opmerkingen met betrekking tot het gebruik van deze R-zin punt 4.2.3.3 voor stoffen en bijlage II, punt A.3, van het KB van 11 januari 1993 voor preparaten.

R64 Kan schadelijk zijn via de borstvoeding

Stoffen en preparaten die in het lichaam van de vrouw worden opgenomen en de melkafscheiding verstoren of (met inbegrip van metabolieten) in zodanige hoeveelheden in de moedermelk aanwezig zijn dat er reden is tot bezorgdheid voor de gezondheid van het kind dat de borst krijgt.

Zie voor opmerkingen met betrekking tot het gebruik van deze R-zin punt 4.2.3.3 voor stoffen en bijlage II, punt A.4, van het KB van 11 januari 1993 voor preparaten.

R66 Herhaalde blootstelling kan een droge of gebarsten huid veroorzaken

Voor stoffen en preparaten die reden kunnen geven tot bezorgdheid als gevolg van droge huid, schilferen of kloven maar niet voldoen aan de criteria voor R38 op basis van :

- hetzij praktische observatie na normaal gebruik,
- hetzij relevante aanwijzingen betreffende hun voorspelde effecten op de huid.

Zie ook de punten 1.6 en 1.7.

R67 Dampen kunnen slaperigheid en duizeligheid veroorzaken

Vluchtige stoffen en preparaten die dergelijke stoffen bevatten welke bij inademing duidelijke symptomen van depressie van het centraal zenuwstelsel veroorzaken en welke nog niet zijn ingedeeld ten aanzien van acute toxiciteit bij inademing (R20, R23, R26, R68/20, R39/23 of R39/26).

De volgende aanwijzingen kunnen worden gebruikt :

(a) Gegevens uit dierstudies waaruit duidelijke tekenen van depressie van het centraal zenuwstelsel blijken zoals verdovende effecten, lethargie, gebrek aan coördinatie (onder meer verlies van evenwicht) en ataxie :

- optredend bij concentraties/blootstellingstijden van niet meer dan 20 mg/l/4 uur, of
- waarbij de verhouding van de effectconcentratie bij  $\leq 4$  uur tot de verzadigde-dampconcentratie (SVC) bij 20 °C is  $\leq 1/10$  is.

(b) Praktijkervaring bij de mens (bijvoorbeeld verdoving, slaperigheid, verminderde waakzaamheid, verlies van reflexen, gebrek aan coördinatie, duizeligheid) uit goed gedocumenteerd onderzoek onder blootstellingsvoorwaarden die vergelijkbaar zijn met die welke hierboven met betrekking tot effecten bij dieren worden genoemd.

Zie ook de punten 1.6 en 1.7.

Zie voor andere aanvullende waarschuwingszinnen punt 2.2.6.

#### 4. INDELING OP BASIS VAN SPECIFIEKE EFFECTEN OP DE GEZONDHEID VAN DE MENS

##### 4.1. Inleiding

4.1.1. Procedure voor de indeling van stoffen die mogelijk de in dit hoofdstuk vermelde effecten hebben. Voor preparaten, zie punt 4.2.4.

4.1.2. Indien een fabrikant, handelaar of importeur informatie ter beschikking heeft die erop wijst dat een stof moet worden ingedeeld en geëtiketteerd volgens de criteria van de punten 4.2.1, 4.2.2 of 4.2.3, moet hij de stof voorlopig overeenkomstig deze criteria etiketteren op basis van een beoordeling van de gegevens door een bevoegd persoon.

4.1.3. De fabrikant, handelaar of importeur moet bij één lidstaat waar de stof op de markt is gebracht, zo spoedig mogelijk een document indienen waarin alle ter zake dienende informatie is samengevat. In dit verband wordt onder ter zake dienende informatie met name alle beschikbare gepubliceerde en ongepubliceerde informatie verstaan die vereist is voor een juiste indeling van de betrokken stof, op basis van de intrinsieke eigenschappen overeenkomstig de categorieën van artikel 1, §4, en conform de criteria van deze bijlage. Het ingediende document dient een bibliografie te bevatten met alle ter zake dienende referenties en zo veel mogelijk ter zake dienende ongepubliceerde gegevens.

4.1.4. Daarnaast dient een fabrikant, handelaar of importeur die over nieuwe gegevens beschikt die voor het indelen en etiketteren van een stof volgens de criteria van de punten 4.2.1, 4.2.2 of 4.2.3 van belang zijn, deze gegevens zo snel mogelijk aan één lidstaat waar de stof op de markt is gebracht te verstrekken.

4.1.5. Om in de gehele Gemeenschap zo spoedig mogelijk tot een uniforme indeling te komen volgens de procedure van artikel 28 van richtlijn 67/548/EEG dienen de lidstaten die beschikken over ter zake dienende informatie, al of niet afkomstig van de fabrikant, welke de indeling van een stof in een van deze categorieën rechtvaardigt, deze informatie tezamen met voorstellen voor de indeling en de etikettering zo spoedig mogelijk aan de Commissie toe te zenden.

De Commissie brengt de overige lidstaten van de voorgestelde indeling en etikettering welke zij heeft ontvangen op de hoogte. Iedere lidstaat kan de Commissie om de ingediende informatie verzoeken.

Iedere lidstaat die op goede gronden meent dat de voorgestelde indeling en etikettering wat betreft carcinogene, mutagene of voor de voortplanting vergiftige effecten onjuist is, dient de Commissie hiervan in kennis te stellen.

##### 4.2. Criteria voor de indeling, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingszinnen

###### 4.2.1. Kankerverwekkende stoffen

Ten behoeve van de indeling en de etikettering en met het oog op de thans beschikbare kennis worden deze stoffen in drie categorieën onderverdeeld :

###### Categorie 1

Stoffen waarvan bekend is dat zij voor de mens kankerverwekkend zijn. Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan de stof en ontwikkeling van kanker.

###### Categorie 2

Stoffen die dienen te worden beschouwd als kankerverwekkend voor de mens. Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan de stof kan leiden tot de ontwikkeling van kanker, meestal op grond van :

- geschikte langdurige dierproeven,
- andere ter zake dienende informatie.

###### Categorie 3

Stoffen die in verband met hun mogelijk kankerverwekkende eigenschappen reden geven tot bezorgdheid voor de mens, maar waarvan de effecten door een tekort aan informatie niet voldoende kunnen worden bepaald. Er zijn aanwijzingen op grond van geschikte dierproeven, maar deze zijn niet voldoende voor indeling van de stof in categorie 2.



4.2.1.1. *De volgende symbolen en waarschuwingszinnen zijn van toepassing :*

Categoriën 1 en 2 :

Stoffen die als carcinogeen van categorie 1 of 2 worden ingedeeld, krijgen het symbool "T" toegekend alsmede de waarschuwingszin

R45 Kan kanker veroorzaken

Stoffen en preparaten waarbij alleen door inademing, bijvoorbeeld in de vorm van stof, damp of rook, gevaar voor kanker bestaat (bij een andere wijze van blootstelling, bijvoorbeeld opname door de mond of aanraking met de huid bestaat geen gevaar voor kanker) krijgen het symbool « T » toegekend alsmede de waarschuwingszin

R49 Kan kanker veroorzaken bij inademing

Categorie 3

Stoffen die als carcinogeen van categorie 3 worden ingedeeld, krijgen het symbool "Xn" toegekend alsmede de waarschuwingszin

R40 Er zijn aanwijzingen voor een kankerverwekkend effect

4.2.1.2. *Opmerkingen betreffende het categoriseren van kankerverwekkende stoffen*

De indeling van een stof in categorie 1 geschiedt op basis van epidemiologische gegevens, de indeling in categorie 2 en 3 hoofdzakelijk op basis van dierproeven.

Voor indeling als kankerverwekkende stof in categorie 2 moeten positieve resultaten bij twee diersoorten voorhanden zijn dan wel duidelijk positief bewijs bij één diersoort alsmede ondersteunend bewijs zoals gegevens met betrekking tot genotoxiciteit, metabolische of biochemische studies, inductie van goedaardige tumoren, een structurele verwantschap met andere bekende kankerverwekkende stoffen of gegevens uit epidemiologische studies die op een relatie duiden.

Categorie 3 bestaat in feite uit 2 deelcategorieën :

(a) stoffen die goed zijn onderzocht maar waarvoor het bewijs voor tumorinducerende effecten onvoldoende is voor indeling in categorie 2. Van aanvullende experimenten wordt niet verwacht dat zij verdere relevante informatie met betrekking tot de indeling opleveren;

(b) stoffen die onvoldoende zijn onderzocht. De beschikbare gegevens zijn ontoereikend, maar geven reden tot bezorgdheid voor de mens. De indeling is voorlopig; verdere experimenten zijn nodig alvorens een definitief besluit kan worden genomen.

Voor het onderscheid tussen categorie 2 en 3 zijn de onderstaande argumenten van belang; zij beperken de betekenis van experimentele tumorinductie met betrekking tot mogelijke blootstelling van de mens. Deze argumenten, met name in combinatie, zullen in de meeste gevallen leiden tot indeling in categorie 3, zelfs wanneer er in dieren tumoren zijn geïnduceerd :

— kankerverwekkende effecten alleen bij zeer hoge dosisniveaus die de "maximaal te verdragen dosis" overschrijden. De maximaal te verdragen dosis wordt gekenmerkt door toxische effecten die, hoewel ze de levensduur nog niet verkorten, gepaard gaan met fysieke veranderingen zoals vertraging van de gewichtstoename met ongeveer 10 %;

— ontstaan van tumoren, met name bij een hoog dosisniveau, alleen in specifieke organen van bepaalde soorten waarvan bekend is dat ze een hoge spontane tumorvorming vertonen;

— ontstaan van tumoren, alleen op de plaats van toediening, in zeer gevoelige testsystemen (bijvoorbeeld i.p. of s.c. toediening van bepaalde plaatselijk actieve verbindingen), wanneer het specifieke doelorgaan voor de mens niet van belang is;

— ontbreken van genotoxiciteit in in vivo en in kortdurende in vitro tests;

— bestaan van een secundair werkingsmechanisme als gevolg waarvan er een praktische grens bestaat (bijvoorbeeld hormonale effecten op doelorganen of op fysiologische regelmechanismen, chronische stimulering van celproliferatie);

— bestaan van soortspecifieke mechanismen van tumorvorming (bijvoorbeeld via specifieke stofwisselingsroutes) die voor de mens niet van belang zijn.

Voor het onderscheid tussen indeling in categorie 3 en niet indelen zijn argumenten van belang op grond waarvan bezorgdheid voor de mens wordt uitgesloten :

— een stof dient in geen van de categorieën te worden ingedeeld wanneer het mechanisme van experimentele tumorvorming duidelijk is bepaald en er deugdelijk bewijs bestaat dat dit proces niet naar de mens kan worden geëxtrapoleerd;

— wanneer de enige gegevens betrekking hebben op het ontstaan van levertumoren in bepaalde gevoelige muizenstammen, en er verder geen ander aanvullend bewijs bestaat, hoeft de stof niet in enige categorie te worden ingedeeld;

— speciale aandacht moet worden geschonken aan gevallen waarin de enige beschikbare gegevens inzake tumoren betrekking hebben op het voorkomen van neoplasma's op plaatsen en in stammen waarvan bekend is dat zij daar spontaan in een hoge frequentie ontstaan.

4.2.2. Mutagene stoffen

4.2.2.1 Ten behoeve van de indeling en de etikettering en met het oog op de thans beschikbare kennis worden deze stoffen in drie categorieën onderverdeeld :

Categorie 1

Stoffen waarvan bekend is dat zij voor de mens mutageen zijn.

Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan de stof en erfelijke genetische schade.

Categorie 2

Stoffen die dienen te worden beschouwd als mutageen voor de mens.

Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan de stof kan leiden tot ontwikkeling van erfelijke genetische schade, meestal op grond van :

— geschikte langdurige dierproeven,

— andere ter zake dienende informatie.

Categorie 3

Stoffen die in verband met hun mogelijke mutagene eigenschappen reden geven tot bezorgdheid voor de mens. Er zijn aanwijzingen op grond van geschikte mutageniteitsstudies maar deze zijn onvoldoende voor indeling van de stof in categorie 2.



#### 4.2.2.2. De volgende symbolen en waarschuwingszinnen zijn van toepassing :

Categoriën 1 en 2 :

Stoffen die als mutageen van categorie 1 of 2 worden ingedeeld, krijgen het symbool "T" toegekend alsmede de waarschuwingszin :

R46 Kan erfelijke genetische schade veroorzaken

Categorie 3 :

Stoffen die als mutageen van categorie 3 worden ingedeeld, krijgen het symbool "Xn" toegekend alsmede de waarschuwingszin :

R68 Onherstelbare effecten zijn niet uitgesloten

#### 4.2.2.3. Opmerkingen betreffende het categoriseren van mutagene stoffen

Definities

Een mutatie is een permanente verandering in de hoeveelheid of de structuur van het genetisch materiaal in een organisme die resulteert in een verandering van de fenotypische kenmerken van het organisme. De wijzigingen kunnen betrekking hebben op een enkel gen, een groep genen of een heel chromosoom. Effecten met betrekking tot een enkel gen kunnen het gevolg zijn van effecten op afzonderlijke DNA-basen (puntmutaties) of van grote veranderingen, inclusief deleties, binnen het gen. Effecten op hele chromosomen kunnen structurele of numerieke veranderingen omvatten. Een mutatie in de geslachtscellen in organismen die zich seksueel voortplanten kan op het nageslacht worden overgedragen. Een mutagene stof is een stof die ervoor zorgt dat mutaties zich in een hogere frequentie voordoen.

Opgemerkt moet worden dat de stoffen die als mutagene stoffen worden ingedeeld, worden ingedeeld onder uitdrukkelijke verwijzing naar erfelijke genetische schade. Het soort resultaten dat leidt tot indeling van chemicaliën in categorie 3 : "inductie van genetisch relevante gebeurtenissen in somatische cellen", wordt in het algemeen tevens gezien als een waarschuwing voor mogelijke kankerverwekkende activiteit.

Het ontwikkelen van methoden voor het testen op mutageniteit is een lopend proces. Voor vele nieuwe tests zijn nog geen gestandaardiseerde protocollen en evaluatiecriteria beschikbaar. Voor de beoordeling van mutageniteitsgegevens moeten de kwaliteit van het testresultaat en de mate van geldigheid van de testmethode in beschouwing worden genomen.

Categorie 1

Om een stof in te delen in categorie 1 is positief bewijs uit epidemiologische studies van mutaties bij de mens nodig. Voorbeelden van dergelijke stoffen zijn tot nu toe niet bekend. Onderkend wordt dat het uiterst moeilijk is om uit studies over het optreden van mutaties in menselijke populaties of een mogelijke toename van de frequentie daarvan, betrouwbare gegevens te verkrijgen.

Categorie 2

Om een stof in te delen in categorie 2 zijn positieve onderzoeksresultaten nodig die in geslachtscellen van zoogdieren in vivo *a)* mutagene effecten of *b)* andere cellulaire voor mutageniteit relevante interacties aantonen of die *c)* in somatische cellen van zoogdieren in vivo mutagene effecten aantonen, maar dan in combinatie met duidelijke aanwijzingen dat de stof of een relevante metabool de geslachtscellen bereikt.

In verband met de indeling in categorie 2 zijn op dit moment de volgende methoden geschikt :

2 (a) In vivo onderzoek van mutageniteit in geslachtscellen :

- specifieke-locusmutatietest;
- overerfbare-translokatietest;
- dominant-letaal-mutatietest.

Met dit onderzoek wordt in feite het ontstaan van aangetast nageslacht of een defect in het zich ontwikkelende embryo aangetoond.

2 (b) In vivo onderzoek waaruit een relevante interactie tussen de verbinding en de geslachtscellen (gewoonlijk DNA) blijkt :

- onderzoek van chromosomale afwijkingen, opgespoord met behulp van cytogenetische analysetechnieken, inclusief aneuploidie als gevolg van een verkeerde segregatie van chromosomen;
- test voor zusterchromatidenuitwisseling;
- test voor ongereguleerde DNA-synthese;
- onderzoek van de (covalente) binding van de mutagene stof aan het DNA van geslachtscellen;
- onderzoek van andere soorten DNA-beschadiging.

Deze testen leveren bewijs van min of meer indirecte aard. Positieve resultaten bij deze testen dienen in de regel te worden bevestigd door positieve resultaten van in vivo onderzoek van mutageniteit van somatische cellen bij zoogdieren of de mens (zie onder 3, bij voorkeur de methoden van 3 a)).

2 (c) In vivo testen die mutagene effecten aantonen in somatische cellen van zoogdieren (zie onder 3 a)), in combinatie met toxicokinetische methoden of andere methoden waarmee kan worden aangetoond dat de verbinding of een relevante metabool de geslachtscellen bereikt.

Voor 2 (b) en 2 (c), kunnen positieve resultaten uit "host-mediated" onderzoek dan wel ondubbelzinnige effecten in in vitro onderzoek als ondersteunend bewijs worden beschouwd.

Categorie 3

Om een stof in te delen in categorie 3 zijn positieve onderzoeksresultaten nodig die in somatische cellen van zoogdieren in vivo *a)* mutagene effecten of *b)* andere cellulaire voor mutageniteit relevante interacties aantonen. Vooral het laatste soort onderzoeksresultaten dient in de regel te worden bevestigd door positieve resultaten uit in vitro mutageniteitsonderzoek.

Voor in vivo onderzoek van somatische cellen zijn op dit moment de volgende methoden geschikt :

3 (a) In vivo onderzoek van mutageniteit in somatische cellen :

- beenmerg-micronucleustest of metafase-analyse;
- metafase-analyse van perifere lymfocyten;
- "mouse coat colour spot test".

## 3 (b) In vivo onderzoek van DNA-interactie in somatische cellen :

- test voor zusterchromatidenuitwisseling in somatische cellen;
- test voor ongereguleerde DNA-synthese in somatische cellen;
- onderzoek van de (covalente) binding van de mutagene stof aan het DNA van somatische cellen;
- onderzoek van DNA-beschadiging, bijv. door basische elutie, in somatische cellen.

Stoffen die alleen in één of meer in vitro mutageniteitstesten positieve resultaten opleveren, dienen doorgaans niet te worden ingedeeld. Verder onderzoek door uitvoering van in vivo onderzoek wordt evenwel ten sterkste aangeraden. In uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld wanneer een verbinding waarvoor geen relevante in vivo gegevens beschikbaar zijn, in meerdere in vitro testen een onmiskenbare positieve reactie geeft en gelijkenis vertoont met bekende mutagene/kankerverwekkende stoffen, kan indeling in categorie 3 worden overwogen.

## 4.2.3. Voor de voortplanting vergiftige stoffen

4.2.3.1. Ten behoeve van de indeling en de etikettering en met het oog op de thans beschikbare kennis, worden deze stoffen in drie categorieën onderverdeeld :

## Categorie 1 :

*Stoffen waarvan bekend is dat zij bij de mens de vruchtbaarheid schaden.*

Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan de stof en verminderde vruchtbaarheid.

*Stoffen waarvan bekend is dat zij bij de mens ontwikkelingsstoornissen veroorzaken.*

Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan de stof en latere ontwikkelingsstoornissen bij het nageslacht.

## Categorie 2

*Stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens de vruchtbaarheid schaden.*

Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan de stof kan leiden tot verminderde vruchtbaarheid, op grond van :

— duidelijk bewijs in dierproeven voor verminderde vruchtbaarheid in afwezigheid van toxische effecten of bewijs voor verminderde vruchtbaarheid bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, die evenwel geen secundaire niet-specifieke gevolgen zijn van die andere toxische effecten;

— andere terzake dienende informatie.

*Stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens ontwikkelingsstoornissen veroorzaken.*

Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan de stof kan leiden tot ontwikkelingsstoornissen, meestal op grond van :

— duidelijke resultaten in geschikte dierproeven waarbij effecten worden waargenomen zonder dat zich bij de moederdieren uitgesproken intoxicatieverschijnselen voordoen of bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, die evenwel geen secundaire niet-specifieke gevolgen zijn van die andere toxische effecten;

— andere terzake dienende informatie.

## Categorie 3

*Voor stoffen die in verband met hun mogelijke voor de vruchtbaarheid van de mens schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid.*

Meestal op grond van :

— resultaten in geschikte dierproeven die voldoende bewijs leveren voor een sterk vermoeden van verminderde vruchtbaarheid in afwezigheid van toxische effecten of van verminderde vruchtbaarheid bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, die evenwel geen secundaire niet-specifieke gevolgen zijn van die andere toxische effecten, maar waarbij de aanwijzingen onvoldoende zijn voor indeling van de stof in categorie 2;

— andere terzake dienende informatie.

*Stoffen die in verband met hun mogelijke voor de ontwikkeling schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid voor de mens.*

Meestal op grond van :

— resultaten in geschikte dierproeven die voldoende bewijs leveren voor een sterk vermoeden van ontwikkelingsstoornissen zonder dat zich bij de moederdieren uitgesproken intoxicatieverschijnselen voordoen of bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, die evenwel geen secundaire niet-specifieke gevolgen zijn van die andere toxische effecten, maar waarbij de aanwijzingen onvoldoende zijn voor indeling van de stof in categorie 2;

— andere terzake dienende informatie.

## 4.2.3.2. De volgende symbolen en waarschuwingssymbolen zijn van toepassing :

## Categorie 1 :

Voor stoffen die bij de mens de vruchtbaarheid schaden :

Stoffen die als voor de voortplanting vergiftig van categorie 1 worden ingedeeld, krijgen het symbool "T" toegekend alsmede de waarschuwingssymbolen :

R60 Kan de vruchtbaarheid schaden

Voor stoffen die ontwikkelingsstoornissen veroorzaken :

Stoffen die als voor de voortplanting vergiftig van categorie 1 worden ingedeeld, krijgen het symbool "T" toegekend alsmede de waarschuwingssymbolen :

R61 Kan het ongeboren kind schaden

## Categorie 2 :

Voor stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens de vruchtbaarheid schaden :

Stoffen die als voor de voortplanting vergiftig van categorie 2 worden ingedeeld, krijgen het symbool "T" toegekend alsmede de waarschuwingssymbolen :

R60 Kan de vruchtbaarheid schaden

Voor stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens ontwikkelingsstoornissen veroorzaken :

Stoffen die als voor de voortplanting vergiftig van categorie 2 worden ingedeeld, krijgen het symbool "T" toegekend alsmede de waarschuwingssymbolen :

R61 Kan het ongeboren kind schaden

### Categorie 3 :

Voor stoffen die in verband met hun mogelijke voor de vruchtbaarheid van de mens schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid :

Stoffen die als voor de voortplanting vergiftig van categorie 3 worden ingedeeld, krijgen het symbool "Xn" toegekend alsmede de waarschuwingzin :

R62 Mogelijk gevaar voor verminderde vruchtbaarheid

Voor stoffen die in verband met hun mogelijke voor de ontwikkeling schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid voor de mens :

Stoffen die als voor de voortplanting vergiftig van categorie 3 worden ingedeeld, krijgen het symbool "Xn" toegekend alsmede de waarschuwingzin :

R63 Mogelijk gevaar voor beschadiging van het ongeboren kind

#### 4.2.3.3. *Opmerkingen betreffende het categoriseren van voor de voortplanting vergiftige stoffen*

Vergiftig zijn voor de voortplanting omvat zowel de vermindering van de vrouwelijke en mannelijke voortplantingsfuncties of -vermogens als het doen ontstaan van niet-erfelijke schadelijke effecten bij het nageslacht. De betrokken stoffen kunnen derhalve worden gerangschikt onder twee categorieën, te weten : 1. Effecten op de vruchtbaarheid van man of vrouw, en 2. Ontwikkelingsstoornissen.

1. Onder effecten op de vruchtbaarheid van man of vrouw worden alle nadelige effecten op libido, seksueel gedrag, de diverse aspecten van de spermatogenese of de oögenese, de hormonale activiteit of de fysiologische respons verstaan die afbreuk doen aan het vermogen te bevruchten, aan de bevruchting zelf dan wel aan de ontwikkeling van de bevruchte eicel tot en met het stadium van de innesteling.

2. De term ontwikkelingsstoornis wordt in de breedst mogelijke zin gebruikt om elk effect dat de normale ontwikkeling, zowel voor als na de geboorte, schaadt, aan te duiden. Het gaat hierbij zowel om effecten die in het prenatale stadium voorkomen of worden geïnduceerd als die welke zich in het postnatale stadium manifesteren. Hieronder vallen voor het embryo en/of de foetus toxische effecten zoals verminderd lichaamsgewicht, vertraagde groei en ontwikkeling, orgaan toxiciteit, sterfte, miskraam, structurele defecten (teratogene effecten), functionele defecten, peri-postnatale defecten en een verstoorde postnatale mentale of fysieke ontwikkeling tot en met het stadium van de normale puberteitsontwikkeling.

De indeling van chemische stoffen als vergiftig voor de voortplanting is bedoeld voor chemische stoffen die de intrinsieke of specifieke eigenschap hebben dergelijke toxische effecten teweeg te brengen. Chemische stoffen moeten niet als zodanig worden ingedeeld als dergelijke effecten uitsluitend het niet-specifieke secundaire gevolg zijn van andere toxische effecten. De stoffen die de meeste reden tot bezorgdheid geven zijn die welke vergiftig voor de voortplanting zijn bij blootstellingsniveaus waarbij zich geen andere toxische effecten voordoen.

De indeling van een stof in categorie 1 in verband met schadelijke effecten op de vruchtbaarheid en/of ontwikkelingsstoornissen geschiedt op basis van epidemiologische gegevens; indeling in categorie 2 of 3 geschiedt hoofdzakelijk op basis van dierproeven. Gegevens uit in vitro onderzoek of studies van vogeleieren worden beschouwd als "ondersteunend bewijs" en zullen bij het niet voorhanden zijn van in vivo gegevens er slechts bij uitzondering toe leiden dat een stof wordt ingedeeld.

Net als bij de meeste andere soorten toxische effecten zullen voor de voortplanting vergiftige stoffen naar verwachting een drempelwaarde hebben waaronder geen nadelige effecten kunnen worden aangetoond. Zelfs als in dierproeven duidelijke effecten worden waargenomen kan de betekenis voor de mens twijfelachtig zijn omdat de effecten zich bijvoorbeeld uitsluitend bij hoge doses voordoen of omdat er duidelijke toxicokinetische verschillen bestaan of de wijze van toediening niet geschikt is. Om deze of vergelijkbare redenen kan indeling in categorie 3 of zelfs niet indelen gerechtvaardigd zijn.

In bijlage V van dit besluit wordt een limiettest beschreven voor stoffen met een geringe toxiciteit. Als uit het oraal toedienen van een dosis van ten minste 1000 mg/kg niet blijkt dat de stof vergiftig is voor de voortplanting, kan testen bij andere dosisniveaus als onnodig worden beschouwd. Als er gegevens voorhanden zijn van testen die zijn uitgevoerd met hogere doses dan de voornoemde limiet, moeten die gegevens worden geëvalueerd samen met andere relevante gegevens. Normaal is dat als effecten zich alleen bij doses hoger dan de limiet voordoen, dit niet noodzakelijkerwijs hoeft te betekenen dat een stof als vergiftig voor de voortplanting wordt ingedeeld.

#### EFFECTEN OP DE VRUCHTBAARHEID

Om een stof vanwege schadelijke effecten op de vruchtbaarheid in te delen in categorie 2 moet doorgaans positief bewijs bij één diersoort alsmede ondersteunend bewijs over hoe of waar de stof aangrijpt voorhanden zijn dan wel een chemische verwantschap met andere bekende onvruchtbaarheid-inducerende stoffen bestaan of moeten andere gegevens met betrekking tot de mens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat het aannemelijk is dat er zich bij de mens effecten zullen voordoen. Daar waar slechts testresultaten bij één diersoort en geen ander relevant ondersteunend bewijs voorhanden zijn, kan indeling in categorie 3 passend zijn.

Omdat verminderde vruchtbaarheid zich kan voordoen als een niet-specifiek neveneffect bij ernstige algehele intoxicatie of in een toestand van ernstige verzwakking, mag een stof pas in categorie 2 worden ingedeeld als is aangetoond dat de stof een zekere mate van specifieke toxiciteit voor het voortplantingssysteem heeft. Als uit de resultaten van dierproeven blijkt dat verminderde vruchtbaarheid het gevolg is van het onvermogen te paren, moet men voor indeling in categorie 2 doorgaans over informatie met betrekking tot het werkingsmechanisme beschikken teneinde na te kunnen gaan of het aannemelijk is dat nadelige effecten, zoals veranderingen in het patroon van hormoonafgifte, zich ook bij de mens manifesteren.

#### ONTWIKKELINGSSTOORNISSEN

Voor indeling in categorie 2 moeten in degelijk uitgevoerde onderzoek bij een of meer diersoorten nadelige effecten duidelijk zijn aangetoond. Omdat nadelige effecten tijdens de zwangerschap of daarna een secundair gevolg kunnen zijn van intoxicatie van het moederdier, verminderde opname van voedsel en water, het optreden van stress bij het moederdier, gebrek aan moederlijke zorg, specifieke tekortkomingen in het dieet, slechte huisvesting, bijkomende infecties, enz. is het van belang dat de effecten zijn waargenomen in degelijk uitgevoerde onderzoeken en bij doses die niet leiden tot een duidelijke intoxicatie van het moederdier. Ook de wijze van toediening is van belang. Zo geldt met name dat het intraperitoneaal injecteren van irriterende stoffen de baarmoeder en de inhoud daarvan kan beschadigen; de resultaten van dergelijke testen moeten derhalve met omzichtigheid worden geïnterpreteerd en vormen op zich doorgaans geen grondslag voor indeling.

De indeling van een stof in categorie 3 geschiedt op basis van dezelfde criteria als voor categorie 2; indeling in categorie 3 kan worden overwogen wanneer de proefopzet hiaten vertoont die de conclusies minder overtuigend maken of wanneer de mogelijkheid niet kan worden uitgesloten dat de effecten het gevolg zijn van niet-specifieke invloeden, zoals algehele intoxicatie.

In het algemeen worden stoffen ingedeeld in categorie 3 of niet ingedeeld op een ad hoc basis als de enige effecten bestaan in kleine veranderingen in het optreden van spontane defecten, kleine veranderingen in de frequentie van van nature voorkomende varianten zoals die worden waargenomen bij skeletonderzoek of kleine verschillen in postnatale-ontwikkelingsstudies.

#### *Effecten tijdens de lactatieperiode*

Stoffen die als vergiftig voor de voortplanting zijn ingedeeld maar ook reden tot bezorgdheid geven in verband met hun effecten op de melkfafscheiding moeten tevens met R64 worden gekenmerkt (zie criteria in punt 3.2.8).

Met het oog op de indeling zij opgemerkt dat toxische effecten op het nageslacht als gevolg van uitsluitend blootstelling via de moedermelk of toxische effecten als gevolg van directe blootstelling van kinderen niet als "voor de voortplanting vergiftig" worden beschouwd, tenzij dergelijke effecten leiden tot een gebrekkige ontwikkeling van het nageslacht.

Stoffen die niet als voor de voortplanting vergiftig zijn ingedeeld maar reden geven tot bezorgdheid als gevolg van hun toxiciteit wanneer ze tijdens de lactatieperiode worden doorgegeven aan de baby, moeten met R64 worden gekenmerkt (zie criteria in punt 3.2.8.). Deze R-zin kan ook geschikt zijn voor stoffen die een nadelige invloed hebben op de kwaliteit of de kwantiteit van de melk.

R64 wordt doorgaans toegekend op basis van :

(a) onderzoeksresultaten op grond waarvan aannemelijk wordt gemaakt dat de stof in potentieel toxische concentraties in de moedermelk voorkomt, en/of

(b) de resultaten van een- of twee-generatiestudies bij dieren waaruit blijkt dat er sprake is van schadelijke effecten bij het nageslacht als gevolg van de melkvoeding, en/of

(c) aanwijzingen bij de mens waaruit blijkt dat baby's tijdens de lactatieperiode gevaar lopen.

Stoffen waarvan bekend is dat ze in het lichaam accumuleren en vervolgens tijdens de lactatieperiode in de melk terecht kunnen komen, worden gekenmerkt met R33 én R64.

#### 4.2.4. Procedure voor de indeling van preparaten in verband met bepaalde specifieke effecten op de gezondheid

Indien een preparaat één of meer stoffen bevat die op basis van bovenstaande criteria zijn ingedeeld, moet het worden ingedeeld overeenkomstig de criteria van bijlage I, deel B, deel 1.7 tot en met 1.9 en deel 2.6 van het KB van 11 januari 1993. (De concentratiegrenzen zijn die van bijlage I van dit besluit, dan wel die van bijlage I, deel B, deel 2.6 van het KB van 11 januari 1993 wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I van dit besluit voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder bijbehorende concentratiegrenzen.)

## 5. INDELING OP BASIS VAN MILIEUEFFECTEN

### 5.1. Inleiding

Met het indelen van voor het milieu gevaarlijke stoffen en preparaten wordt in eerste instantie beoogd de gebruiker te wijzen op de gevaren van deze stoffen en preparaten voor ecosystemen. Hoewel de onderstaande criteria betrekking hebben op aquatische ecosystemen ziet men wel in dat bepaalde stoffen en preparaten eveneens of uitsluitend ook andere ecosystemen kunnen aantasten waarvan de componenten kunnen variëren van de microflora en microfauna in de bodem tot primaten.

Onderstaande criteria vloeien rechtstreeks voort uit de testmethoden van bijlage V voorzover zij daarin worden vermeld. De voor het in bijlage VII vermelde "basisdossier" benodigde testmethoden zijn beperkt en de informatie die eraan ontleend kan voor een passende indeling onvoldoende zijn. Voor het indelen kunnen aanvullende gegevens nodig zijn die worden ontleend aan niveau 1 (bijlage VIII) of andere gelijkwaardige studies. Bovendien kan het nodig zijn, reeds ingedeelde stoffen in het licht van nieuwe gegevens opnieuw te bezien.

Ten behoeve van de indeling en de etikettering en met het oog op de thans beschikbare kennis worden dergelijke stoffen en preparaten in twee categorieën onderverdeeld op basis van hun acute en/of langetermijneffecten in aquatische systemen of hun acute en/of langetermijneffecten in niet-aquatische systemen.

5.1.1. De indeling van de stoffen wordt meestal gebaseerd op experimentele gegevens inzake acute toxiciteit voor aquatische organismen, afbreekbaarheid en  $\log P_{ow}$  (of BCF, indien beschikbaar).

5.1.2. De indeling van preparaten geschiedt doorgaans op basis van een in artikel 5, § 3 en bijlage I, deel C, delen 1 en 2 van het KB van 11 januari 1993 bedoelde gebruikelijke methode. In dit geval is de indeling gebaseerd op de afzonderlijke concentratiegrenzen die worden vermeld in :

— bijlage I van dit besluit, of

— bijlage I, deel C, deel 2 van het KB van 11 januari 1993 wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I van dit besluit voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder bijbehorende concentratiegrenzen.

5.1.3. Doorgaans geschiedt de indeling van een preparaat op basis van een gebruikelijke methode. Ter bepaling van de acute toxiciteit voor aquatische organismen kan het evenwel in bepaalde gevallen dienstig zijn, tests met het preparaat uit te voeren. De resultaten van deze tests met het preparaat dienen uitsluitend voor het bijstellen van de indeling inzake acute toxiciteit voor aquatische organismen die het resultaat zou zijn van de toepassing van een gebruikelijke methode. Indien deze tests worden gekozen door de persoon die voor het in de handel brengen van het preparaat verantwoordelijk is, moet ervoor worden gezorgd dat aan de kwaliteitscriteria van de testmethoden van bijlage V, deel C, van dit besluit wordt voldaan. Bovendien moeten de tests overeenkomstig de criteria van deze bijlage op de drie groepen organismen (algen, Daphnia en vissen) worden uitgevoerd, tenzij het preparaat na beproeving op één type organismen in de hoogste gevarenklasse inzake aquatische toxiciteit wordt ingedeeld of er reeds een testresultaat beschikbaar was vóór richtlijn 1999/45/EG in werking trad.



## 5.2 Criteria voor de indeling, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingsszinnen

De indelingscriteria voor stoffen van punt 5.2.1. zijn alleen van toepassing op preparaten indien deze overeenkomstig punt 5.1.3. werden getest.

### 5.2.1. Aquatisch milieu

5.2.1.1. Stoffen worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu en gekenmerkt met het symbool « N » en de passende gevaarsaanduiding en krijgen waarschuwingsszinnen toegekend volgens de onderstaande criteria :

R50 Zeer vergiftig voor in het water levende organismen en

R53 Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Acute toxiciteit :	96 h LC <sub>50</sub> (voor vissen)	≤ 1 mg/l
	of	48 h EC <sub>50</sub> (voor Daphnia)
	of	72 h IC <sub>50</sub> (voor algen)

en

— de stof is niet gemakkelijk afbreekbaar of

—  $\log P_{ow}$  (log verdelingscoëfficiënt octanol/water)  $\geq 3,0$  (tenzij de experimenteel bepaalde BCF  $\leq 100$ ).

R50 Zeer vergiftig voor in het water levende organismen

Acute toxiciteit :	96 h LC <sub>50</sub> (voor vissen)	≤ 1 mg/l
	of	48 h EC <sub>50</sub> (voor Daphnia)
	of	172 h IC <sub>50</sub> (voor algen)

R51 : Vergiftig voor in het water levende organismen en

R53 : Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Acute toxiciteit :	96 h LC <sub>50</sub> (voor vissen)	1 mg/l < LC <sub>50</sub> ≤ 10 mg/l
	of	48 h EC <sub>50</sub> (voor Daphnia)
	of	72 h IC <sub>50</sub> (voor algen)

en

— de stof is niet gemakkelijk afbreekbaar of

—  $\log P_{ow} \geq 3,0$  (tenzij de experimenteel bepaalde BCF  $\leq 100$ ).

5.2.1.2. Stoffen worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu overeenkomstig de onderstaande criteria. Waarschuwingsszinnen worden eveneens toegekend volgens de volgende criteria :

R52 : Schadelijk voor in het water levende organismen en

R53 : Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Acute toxiciteit :	96 h LC <sub>50</sub> (voor vissen)	10 mg/l < LC <sub>50</sub> ≤ 100 mg/l
	of	48 h EC <sub>50</sub> (voor Daphnia)
	of	72 h IC <sub>50</sub> (voor algen)

en

de stof is niet gemakkelijk afbreekbaar.

Dit criterium is van toepassing tenzij er voldoende aanvullend wetenschappelijk bewijs inzake degradatie en/of toxiciteit bestaat om afdoende zekerheid te bieden dat noch de stof, noch haar degradatieproducten een potentieel langetermijn- en/of vertraagd gevaar voor het aquatisch milieu vormen. Dergelijk aanvullend wetenschappelijk bewijs dient normaliter te zijn gebaseerd op de op niveau 1 (bijlage VIII) vereiste studies dan wel gelijkwaardige studies en kan het volgende omvatten :

(i) een bewezen vermogen tot snelle degradatie in het aquatisch milieu;

(ii) het ontbreken van chronische toxiciteitseffecten bij een concentratie van 1,0 mg/l, bijvoorbeeld indien bij een concentratie van meer dan 1,0 mg/l in een langdurige toxiciteitsstudie met vissen of Daphnia geen effecten worden waargenomen.

R52 Schadelijk voor in het water levende organismen

Stoffen die niet onder bovenstaande criteria in dit hoofdstuk vallen, maar die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun toxiciteit toch een gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van aquatische ecosystemen.

R53 Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Stoffen die niet onder bovenstaande criteria in dit hoofdstuk vallen, maar die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun persistentie, accumulatievermogen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu toch een langetermijn- en/of vertraagd gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van aquatische ecosystemen.

Slecht in water oplosbare stoffen, dit wil zeggen stoffen met een oplosbaarheid van minder dan 1 mg/l vallen onder dit criterium als :

(a) ze niet gemakkelijk afbreekbaar zijn, en

(b)  $\log P_{ow} \geq 3,0$  (tenzij de experimenteel bepaalde BCF  $\leq 100$ )

Dit criterium is op stoffen van toepassing tenzij er voldoende aanvullend wetenschappelijk bewijs inzake afbraak en/of toxiciteit bestaat om afdoende zekerheid te bieden dat noch de stof noch haar afbraakproducten een potentieel langetermijn- en/of vertraagd gevaar voor het aquatisch milieu vormen.



Dergelijk aanvullend wetenschappelijk bewijs dient normaliter te zijn gebaseerd op de op niveau 1 (bijlage VIII) vereiste studies dan wel gelijkwaardige studies en kan het volgende omvatten :

(i) een bewezen vermogen tot snelle degradatie in het aquatisch milieu;

(ii) het ontbreken van chronische toxiciteitseffecten bij de oplosbaarheids grens, bijvoorbeeld indien bij een concentratie hoger dan de oplosbaarheids grens in een langdurige toxiciteitsstudie met vissen of *Daphnia* geen effecten worden waargenomen.

5.2.1.3. *Opmerkingen betreffende de bepaling van IC<sub>50</sub> voor algen en de afbreekbaarheid*

— waar in geval van sterk gekleurde stoffen kan worden aangetoond dat algengroei uitsluitend als gevolg van een reductie in lichtintensiteit wordt geremd, mag de 72h IC<sub>50</sub> voor algen niet als basis voor indeling worden gebruikt;

— stoffen worden als gemakkelijk afbreekbaar beschouwd wanneer de volgende criteria gelden :

(a) Wanneer in biodegradatiestudies van 28 dagen de volgende degradatieniveaus worden bereikt :

— in op opgeloste organische koolstof gebaseerde tests : 70 %,

— in op zuurstofdepletie of koolstofdioxideontwikkeling gebaseerde tests : 60 % van het theoretische maximum.

Deze biodegradatieniveaus moeten worden bereikt binnen 10 dagen na het begin van de degradatie, dat wordt gesteld als het moment waarop 10 % van de stof is afgebroken;

of

(b) in die gevallen waarin alleen gegevens over COD en BOD<sub>5</sub> beschikbaar zijn, indien het BOD<sub>5</sub>/COD-quotiënt groter of gelijk is aan 0,5;

of

(c) als ander overtuigend wetenschappelijk bewijs beschikbaar is om aan te tonen dat de stof in het aquatisch milieu kan worden afgebroken (biotisch en/of abiotisch) tot > 70 % binnen een periode van 28 dagen.

5.2.2. Niet-aquatisch milieu

5.2.2.1. Stoffen en preparaten worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu en gekenmerkt met het symbool "N" en de passende gevaarsaanduiding en krijgen waarschuwingssymbolen toegekend volgens de onderstaande criteria :

R54 Vergiftig voor planten

R55 Vergiftig voor dieren

R56 Vergiftig voor bodemorganismen

R57 Vergiftig voor bijen

R58 Kan in het milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Stoffen en preparaten die op basis van de beschikbare gegevens met betrekking tot hun toxiciteit, persistentie, accumulatievermogen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu een direct of langetermijn- en/of vertraagd gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van andere dan onder punt 5.2.1 vallende natuurlijke ecosystemen. Gedetailleerde criteria worden later uitgewerkt.

5.2.2.2. Stoffen en preparaten worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu en gekenmerkt met het symbool « « N » » en - in voorkomend geval - de passende gevaarsaanduiding en krijgen waarschuwingssymbolen toegekend volgens de onderstaande criteria :

R59 Gevaarlijk voor de ozonlaag

Stoffen die op basis van de beschikbare gegevens met betrekking tot hun eigenschappen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu een gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van de ozonlaag. Hieronder vallen de stoffen die zijn opgenomen in bijlage I van Verordening (EG) nr. 2037/2000 van het Europees Parlement en de Raad van 29 juni 2000 betreffende stoffen die de ozonlaag afbreken (PB L 244 van 29.9.2000, blz.1) en de wijzigingen daarvan.

Preparaten worden ingedeeld op basis van een in artikel 5, §3 en bijlage I, deel C, delen 1 en 2, van het KB van 11 januari 1993 genoemde gebruikelijke methode.

6. KEUZE VAN VEILIGHEIDSAANBEVELINGEN

6.1. **Inleiding**

Veiligheidsaanbevelingen (S-zinnen) worden toegekend aan gevaarlijke stoffen en preparaten overeenkomstig de volgende algemene criteria. Bovendien zijn voor bepaalde preparaten de veiligheidsaanbevelingen opgenomen in bijlage II van het KB van 11 januari 1993 verplicht.

Overall waar in hoofdstuk 6 wordt gerefereerd aan de "fabrikant" wordt de persoon bedoeld die voor het in de handel brengen van de stof of het preparaat verantwoordelijk is.

6.2. **Veiligheidsaanbevelingen voor stoffen en preparaten**

S1 *Achter slot bewaren*

— Toepassing :

— zeer giftige, giftige en bijtende stoffen en preparaten.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor bovengenoemde stoffen en preparaten indien ze aan het grote publiek worden verkocht.

S2 *Buiten het bereik van kinderen bewaren*

— Toepassing :

— alle gevaarlijke stoffen en preparaten.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor alle gevaarlijke stoffen en preparaten die aan het grote publiek worden verkocht, behalve voor deze die enkel ingedeeld zijn als gevaarlijk voor het milieu.

S3 *Op een koele plaats bewaren*

— Toepassing :

— organische peroxiden;

— andere gevaarlijke stoffen en preparaten met een kookpunt ≤ 40 °C.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor organische peroxiden, tenzij S47 wordt gebruikt;

— aanbevolen voor andere gevaarlijke stoffen en preparaten met een kookpunt ≤ 40 °C.

**S4 Verwijderd van woonruimten opbergen**

- Toepassing :
- zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :

— doorgaans beperkt tot zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten als wenselijke aanvulling op S13, bijvoorbeeld wanneer het inademen ervan gevaar oplevert en de stof of het preparaat buiten woonruimten moet worden bewaard. De aanbeveling houdt niet in dat de stof of het preparaat niet op de juiste wijze in woonruimten mag worden gebruikt.

**S5 Onder ... houden (geschikte vloeistof aan te geven door fabrikant)**

- Toepassing :
- vaste stoffen en preparaten die spontaan kunnen ontvlammen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals natrium, kalium of witte fosfor.

**S6 Onder ... houden (inert gas aan te geven door fabrikant)**

- Toepassing :
- gevaarlijke stoffen en preparaten die in een inerte atmosfeer moeten worden bewaard.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals bepaalde organische metaalverbindingen.

**S7 In goed gesloten verpakking bewaren**

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- stoffen en preparaten die zeer vergiftige, vergiftige, schadelijke of zeer licht ontvlambare gassen kunnen ontwikkelen;

- stoffen en preparaten die in contact met vocht zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;
- licht ontvlambare vaste stoffen.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor organische peroxiden;
- aanbevolen voor de overige bovengenoemde toepassingen.

**S8 Verpakking droog houden**

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die heftig met water kunnen reageren;
- stoffen en preparaten die in contact met water zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;
- stoffen en preparaten die in contact met water zeer vergiftige of vergiftige gassen ontwikkelen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bovengenoemde toepassingen wanneer de waarschuwingen R14 en R15 in het bijzonder en R29 moeten worden benadrukt.

**S9 Op een goed geventileerde plaats bewaren**

- Toepassing :
- vluchtige stoffen en preparaten die zeer vergiftige, vergiftige of schadelijke dampen kunnen ontwikkelen;
- zeer licht ontvlambare of licht ontvlambare vloeistoffen en zeer licht ontvlambare gassen.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor vluchtige stoffen en preparaten die zeer vergiftige, vergiftige of schadelijke dampen kunnen ontwikkelen;
- aanbevolen voor zeer licht ontvlambare en licht ontvlambare vloeistoffen of zeer licht ontvlambare gassen.

**S12 De verpakking niet hermetisch sluiten**

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die door het ontwikkelen van gassen of dampen de verpakking kunnen doorbreken.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bovengenoemde bijzondere gevallen.

**S13 Verwijderd houden van eet- en drinkwaren en van diervoeder**

- Toepassing :
- zeer vergiftige, vergiftige en schadelijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen wanneer die stoffen en preparaten waarschijnlijk ook door het grote publiek zullen worden gebruikt.

**S14 Verwijderd houden van... (stoffen waarmee contact vermeden dient te worden, aan te geven door de fabrikant)**

- Toepassing :
- organische peroxiden.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor en doorgaans beperkt tot organische peroxiden. Bij uitzondering echter ook in andere gevallen bruikbaar wanneer contact met bepaalde andere stoffen een bijzonder gevaar oplevert.

**S15 Verwijderd houden van warmte**

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die onder invloed van warmte kunnen ontleden of spontaan kunnen reageren.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals monomeren, maar niet wanneer de waarschuwingsszinnen R2, R3 en/of R5 al zijn toegekend.

*S16 Verwijderd houden van ontstekingsbronnen - niet roken*

— Toepassing :

— zeer licht ontvlambare of licht ontvlambare vloeistoffen en zeer licht ontvlambare gassen.

— Gebruiskriteria :

— aanbevolen voor bovengenoemde stoffen en preparaten maar niet wanneer de waarschuwingssinnen R2, R3 en/of R5 al zijn toegekend.

*S17 Verwijderd houden van brandbare stoffen*

— Toepassing :

— stoffen en preparaten die samen met brandbare stoffen ontplofbare of spontaan ontvlambare mengsels kunnen vormen.

— Gebruiskriteria :

— beschikbaar voor gebruik in bijzondere gevallen, bijvoorbeeld om R8 en R9 te benadrukken.

*S18 Verpakking voorzichtig behandelen en openen*

— Toepassing :

— stoffen en preparaten die in de verpakking een overdruk kunnen ontwikkelen;

— stoffen en preparaten die ontplofbare peroxiden kunnen vormen.

— Gebruiskriteria :

— doorgaans beperkt tot bovengenoemde gevallen wanneer er gevaar bestaat voor beschadiging van de ogen en/of wanneer de stoffen en preparaten waarschijnlijk ook door het grote publiek zullen worden gebruikt.

*S20 Niet eten of drinken tijdens gebruik*

— Toepassing :

— zeer vergiftige, vergiftige en bijtende stoffen en preparaten.

— Gebruiskriteria :

— doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen (bijvoorbeeld arseen en arseenverbindingen, fluoracetaten), vooral wanneer deze stoffen en preparaten waarschijnlijk ook door het grote publiek zullen worden gebruikt.

*S21 Niet roken tijdens gebruik*

— Toepassing :

— stoffen en preparaten die bij verbranding giftige producten vormen.

— Gebruiskriteria :

— doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals gehalogeneerde verbindingen.

*S22 Stof niet inademen*

— Toepassing :

— alle vaste stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor de gezondheid.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor bovengenoemde stoffen en preparaten waaraan R42 is toegekend;

— aanbevolen voor bovengenoemde stoffen en preparaten die in de vorm van inhaalbaar stof worden geleverd en waarvoor de gezondheidsrisico's bij inademing onbekend zijn.

*S23 Gas/rook/damp/spuitnevel niet inademen (toepasselijke term(en) aan te geven door de fabrikant)*

— Toepassing :

— alle vloeibare of gasvormige stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor de gezondheid.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor bovengenoemde stoffen en preparaten waaraan R42 is toegekend;

— verplicht voor stoffen en preparaten bedoeld om te spuiten. In aanvulling hierop moet S38 of S51 worden toegekend;

— aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op inademingsgevaar dat niet in de toegekende waarschuwingssinnen is vermeld.

*S24 Aanraking met de huid vermijden*

— Toepassing :

— alle stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor de gezondheid.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor de stoffen en preparaten waaraan R43 is toegekend tenzij S36 ook al is toegekend;

— aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op gevaar van huidcontact (bijv. paresthesie) dat niet in de toegekende waarschuwingssinnen is vermeld. Ook bruikbaar om dergelijke waarschuwingssinnen te benadrukken.

*S25 Aanraking met de ogen vermijden*

— Toepassing :

— alle stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor de gezondheid.

— Gebruiskriteria :

— aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op gevaar van oogcontact dat niet in de toegekende waarschuwingssinnen is vermeld. Ook bruikbaar om dergelijke waarschuwingssinnen te benadrukken;

— aanbevolen voor stoffen waaraan R34, R35, R36 of R41 is toegekend en die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt.

*S26 Bij aanraking met de ogen onmiddellijk met overvloedig water afspoelen en deskundig medisch advies inwinnen*

— Toepassing :

— bijtende en irriterende stoffen en preparaten.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor bijtende stoffen en preparaten en voor stoffen en preparaten waaraan R41 al is toegekend;

— aanbevolen voor irriterende stoffen en preparaten waaraan R36 al is toegekend.

*S27 Verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken*

- Toepassing :
- zeer vergiftige, vergiftige of bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor zeer vergiftige stoffen en preparaten waaraan R27 is toegekend en die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt;
- aanbevolen voor zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten waaraan R27 is toegekend en die in de industrie worden gebruikt. Deze veiligheidsaanbeveling evenwel niet gebruiken indien S36 is toegekend;
- aanbevolen voor vergiftige stoffen en preparaten waaraan R24 is toegekend en bijtende stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt.

*S28 Na aanraking met de huid onmiddellijk wassen met veel... (aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- zeer vergiftige, vergiftige of bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor zeer vergiftige stoffen en preparaten;
- aanbevolen voor de overige bovengenoemde stoffen en preparaten, vooral wanneer water niet de meest geschikte vloeistof is om mee te spoelen;
- aanbevolen voor bijtende stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt.

*S29 Afval niet in de gootsteen werpen*

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare of licht ontvlambare vloeistoffen die niet mengbaar zijn met water;
- zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten;
- stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor het milieu.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor milieugevaarlijke stoffen en preparaten waaraan het symbool "N" is toegekend en die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt, tenzij dit het beoogde gebruik is;
- aanbevolen voor de overige bovengenoemde stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt, tenzij dit het beoogde gebruik is.

*S30 Nooit water op deze stof gieten*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die heftig met water reageren.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen (bijvoorbeeld zwavelzuur) en eventueel bruikbaar om R14 te benadrukken of te vervangen teneinde de duidelijkst mogelijke informatie te geven.

*S33 Maatregelen treffen tegen ontladingen van statische elektriciteit*

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare en licht ontvlambare stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor industrieel gebruikte stoffen en preparaten die geen vocht absorberen. Vrijwel nooit gebruikt voor stoffen en preparaten die in de handel worden gebracht om door het grote publiek te worden gebruikt.

*S35 Deze stof en de verpakking op veilige wijze afvoeren*

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor stoffen en preparaten waarvoor speciale aanwijzingen nodig zijn om te zorgen dat zij adequaat worden verwijderd.

*S36 Draag geschikte beschermende kleding*

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- zeer vergiftige, vergiftige en schadelijke stoffen en preparaten;
- bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor zeer vergiftige en bijtende stoffen en preparaten;
- verplicht voor stoffen en preparaten waaraan R21 of R24 is toegekend;
- verplicht voor kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige stoffen van categorie 3, tenzij de effecten uitsluitend optreden na inademing van de stof of het preparaat;
- verplicht voor organische peroxiden;
- aanbevolen voor vergiftige stoffen en preparaten indien de LD<sub>50</sub>-waarde (dermaal) onbekend is maar de stof of het preparaat bij huidcontact waarschijnlijk toxisch is;
- aanbevolen voor industrieel gebruikte stoffen en preparaten die bij langdurige blootstelling waarschijnlijk de gezondheid schaden.

*S37 Draag geschikte handschoenen*

- Toepassing :
- zeer vergiftige, vergiftige, schadelijke of bijtende stoffen en preparaten;
- organische peroxiden
- stoffen en preparaten die de huid irriteren of sensibiliserend zijn bij huidcontact.

- Gebruiskriteria :
- verplicht voor zeer vergiftige en bijtende stoffen en preparaten;
- verplicht voor stoffen en preparaten waaraan R21, R24 of R43 is toegekend;
- verplicht voor kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige stoffen van categorie 3, tenzij de effecten uitsluitend optreden na inademing van de stof of het preparaat;
- verplicht voor organische peroxiden;
- aanbevolen voor vergiftige stoffen en preparaten indien de LD<sub>50</sub>-waarde (dermaal) onbekend is maar de stof of het preparaat bij huidcontact waarschijnlijk toxisch is;
- aanbevolen voor stoffen en preparaten die de huid irriteren.

*S38 Bij ontoereikende ventilatie een geschikte adembescherming dragen*

- Toepassing :
- zeer vergiftige of vergiftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen waarin zeer vergiftige of vergiftige stoffen en preparaten in de industrie of in de landbouw worden gebruikt.

*S39 Een bescherming voor de ogen/voor het gezicht dragen*

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- bijtende stoffen en preparaten, met inbegrip van irriterende stoffen die gevaar voor ernstig oogletsel opleveren;
- zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor stoffen en preparaten waaraan R34, R35 of R41 is toegekend;
- verplicht voor organische peroxiden;
- aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op gevaar voor oogletsel dat niet in de toegekende waarschuwingszinnen is vermeld;
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen voor zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten die kans op spatten geven en die waarschijnlijk gemakkelijk door de huid worden geabsorbeerd.

*S40 Voor de reiniging van de vloer en alle voorwerpen verontreinigd met dit materiaal... gebruiken (aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot de gevaarlijke stoffen en preparaten waarvoor water niet het meest geschikte reinigingsmiddel is (bijvoorbeeld wanneer absorptie door poedervormig materiaal of oplossen met een oplosmiddel nodig is) en waarbij met het oog op de gezondheid en/of de veiligheid een waarschuwing op het etiket van belang is.

*S41 In geval van brand en/of explosie inademen van rook vermijden*

- Toepassing :
- gevaarlijke stoffen en preparaten die bij verbranding zeer vergiftige of vergiftige gassen ontwikkelen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen.

*S42 Tijdens de ontsmetting/bespuiting een geschikte adembescherming dragen (toepasselijke term(en) aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die voor een dergelijk gebruik bedoeld zijn maar die, indien geen goede voorzorgsmaatregelen worden getroffen, de gezondheid en de veiligheid van de gebruiker in gevaar kunnen brengen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen.

*S43 In geval van brand... gebruiken (blusmiddelen aan te geven door de fabrikant. Indien water het risico vergroot, toevoegen : "Nooit water gebruiken")*

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare, licht ontvlambare en ontvlambare stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor stoffen en preparaten die in contact met water of vochtige lucht zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;
- aanbevolen voor zeer licht ontvlambare, licht ontvlambare en ontvlambare stoffen en preparaten, in het bijzonder wanneer deze niet mengbaar zijn met water.

*S45 Bij een ongeval of indien men zich onwel voelt, onmiddellijk een arts raadplegen (indien mogelijk hem dit etiket tonen)*

- Toepassing :
- zeer vergiftige stoffen en preparaten;
- vergiftige en bijtende stoffen en preparaten;
- stoffen en preparaten die sensibiliserend zijn bij inademing.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor bovenbedoelde stoffen en preparaten.

*S46 In geval van inslikken, onmiddellijk een arts raadplegen en de verpakking of het etiket tonen*

- Toepassing :
- alle andere gevaarlijke stoffen en preparaten dan die welke zeer vergiftig, vergiftig, bijtend of gevaarlijk voor het milieu zijn.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor alle bovengenoemde gevaarlijke stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt, tenzij inslikken, in het bijzonder voor kinderen, geen enkel gevaar oplevert.



S47 *Bewaren bij een temperatuur beneden... °C (aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die bij een bepaalde temperatuur instabiel worden.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen (bijvoorbeeld bepaalde organische peroxiden).

S48 *Inhoud vochtig houden met.... (middel aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die bij opdrogen zeer gevoelig kunnen worden voor vonken, wrijving of stoten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals nitrocellulosen.

S49 *Uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die gevoelig zijn voor katalytische ontleding.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot stoffen en preparaten die gevoelig zijn voor katalytische ontleding (bijvoorbeeld bepaalde organische peroxiden).

S50 *Niet vermengen met... (aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die met de aangegeven stof kunnen reageren onder vorming van zeer vergiftige of vergiftige gassen;
- organische peroxiden.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor bovengenoemde stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt, wanneer dit de voorkeur verdient boven R31 of R32;
- verplicht voor bepaalde peroxiden die met versnellers of promotors een heftige reactie kunnen geven.

S51 *Uitsluitend op goed geventileerde plaatsen gebruiken*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die al of niet bedoeld damp, rook, nevel, stof en dergelijke kunnen vormen die gevaar bij inademing of brand- of ontploffingsgevaar opleveren.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen wanneer het gebruik van S38 minder geschikt is. Vooral belangrijk wanneer dergelijke stoffen en preparaten waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt.

S52 *Niet voor gebruik op grote oppervlakken in woon- en verblijfruimten*

- Toepassing :
- vluchtige zeer vergiftige, vergiftige en schadelijke stoffen en preparaten die deze stoffen bevatten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen wanneer langdurige blootstelling hieraan door verdamping uit grote behandelde oppervlakken in woon- en verblijfruimten waarschijnlijk gezondheidsschade veroorzaakt.

S53 *Blootstelling vermijden - vóór gebruik speciale aanwijzingen raadplegen*

- Toepassing :
- kankerverwekkende, mutagene en/of voor de voortplanting vergiftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor bovengenoemde stoffen en preparaten waaraan ten minste een van de volgende R-zinnen is toegekend : R45, R46, R49, R60 of R61.

S56 *Deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen*

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor alle gevaarlijke stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt en die op een bijzondere manier moeten worden verwijderd.

S57 *Neem passende maatregelen om verspreiding in het milieu te voorkomen*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten waaraan het symbool "N" is toegekend.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot stoffen en preparaten die waarschijnlijk niet door het grote publiek zullen worden gebruikt.

S59 *Raadpleeg fabrikant voor informatie over terugwinning/recycling*

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor de ozonlaag;
- aanbevolen voor andere stoffen en preparaten waarvan terugwinning/recycling wordt aanbevolen.

S60 *Deze stof en de verpakking als gevaarlijk afval afvoeren*

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor stoffen en preparaten die waarschijnlijk niet door het grote publiek zullen worden gebruikt en waaraan S35 niet is toegekend.

*S61 Voorkom lozing in het milieu. Vraag om speciale instructies/veiligheidskaart*

— Toepassing :

— stoffen en preparaten die gevaarlijk zijn voor het milieu.

— Gebruiskriteria :

— doorgaans gebruikt voor stoffen en preparaten waaraan het symbool "N" is toegekend;

— aanbevolen voor alle andere als gevaarlijk voor het milieu ingedeelde stoffen en preparaten dan bovenstaande.

*S62 Bij inslikken niet het braken opwekken; direct een arts raadplegen en de verpakking of het etiket tonen*

— Toepassing :

— stoffen en preparaten die als schadelijk zijn ingedeeld en waaraan overeenkomstig de in punt 3.2.3 aangegeven criteria R65 is toegekend;

— niet van toepassing op stoffen en preparaten die in spuitbussen (of in houders die zijn voorzien van een vaste verstuiver) op de markt worden gebracht; zie de punten 8 en 9.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor bovengenoemde stoffen en preparaten indien ze aan het grote publiek worden verkocht of waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt, behalve wanneer S45 of S46 verplicht is;

— aanbevolen voor bovengenoemde stoffen en preparaten wanneer die in de industrie worden gebruikt, behalve wanneer S45 of S46 verplicht is.

*S63 Bij een ongeval door inademing : slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten*

— Toepassing :

— zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten (gassen, dampen, deeltjes, vluchtige vloeistoffen);

— stoffen en preparaten die sensibiliserend zijn bij inademing.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor stoffen en preparaten waaraan R26, R23 of R42 is toegekend en die waarschijnlijk door het grote publiek zodanig zullen worden gebruikt dat inademing mogelijk is.

*S64 Bij inslikken mond met water spoelen (alleen als de persoon bij bewustzijn is)*

— Toepassing :

— bijtende of irriterende stoffen en preparaten

— Gebruiskriteria :

— aanbevolen voor bovengenoemde stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek zullen worden gebruikt en waarbij bovengenoemde behandeling geschikt is.

## 7. ETIKETTERING

7.1. Wanneer een stof of preparaat is ingedeeld, wordt op basis van de eisen van artikel 8, § 1, van dit besluit en artikel 9 van het KB van 11 januari 1993 voor respectievelijk stoffen en preparaten het geschikte etiket vastgesteld. In deze paragraaf, die met name dient als leidraad bij de keuze van de geschikte waarschuwingsszinnen en veiligheidsaanbevelingen, wordt verklaard hoe de vermeldingen op het etiket worden vastgesteld.

Het etiket bevat de volgende informatie :

(a) voor preparaten, de benaming of handelsnaam;

(b) voor stoffen, de naam van de stof en voor preparaten, de namen van de in het preparaat aanwezige stoffen overeenkomstig de regels van artikel 9, § 2, punt 2.3, van het KB van 11 januari 1993;

(c) de naam, het volledig adres en het telefoonnummer van de persoon die voor het in de handel brengen van de stof of het product verantwoordelijk is, of het nu de fabrikant, de importeur of de distributeur is;

(d) het (de) gevaarsymbool (gevaarsymbolen) en de gevaarsaanduiding(en);

(e) de standaardvermeldingen van de bijzondere gevaren (R-zinnen);

(f) de standaardvermeldingen van de veiligheidsaanbevelingen (S-zinnen);

(g) voor stoffen, het EG-nummer, en voorts voor stoffen die in bijlage I worden opgevoerd, de vermelding "EG-etikettering";

(h) voor preparaten die aan het grote publiek worden aangeboden of verkocht, de nominale hoeveelheid, tenzij deze elders op de verpakking wordt vermeld.

Nota

Voor bepaalde preparaten gelden aanvullende etiketteringsvoorschriften overeenkomstig artikel 9, § 1, punt 1.2, en bijlage II van het KB van 11 januari 1993 en artikel 40 van het KB van 5 september 2001.

## 7.1.1. Uiteindelijke keuze van waarschuwingsszinnen en veiligheidsaanbevelingen

Hoewel de uiteindelijke keuze van waarschuwingsszinnen en veiligheidsaanbevelingen in de eerste plaats wordt bepaald door de noodzaak alle benodigde informatie te verschaffen, dient ook te worden gelet op de duidelijkheid en het effect van het etiket. Met het oog op de duidelijkheid dienen voor de noodzakelijke informatie zo weinig mogelijk zinnen te worden gebruikt.

Voor irriterende, licht ontvlambare, ontvlambare of oxiderende stoffen behoeven de R- en S-zinnen niet te worden vermeld indien de inhoud van de verpakking niet meer dan 125ml bedraagt. Dit geldt eveneens voor de schadelijke stoffen, bij dezelfde inhoud, die niet in de detailhandel aan het publiek worden verkocht.

Voor preparaten waarbij de inhoud van de verpakking niet meer bedraagt dan 125 ml, geldt :

— als het preparaat is ingedeeld als licht ontvlambaar, oxiderend, irriterend met uitzondering van preparaten waaraan R41 is toegekend, of gevaarlijk voor het milieu waarbij ook het symbool "N" is toegekend, hoeven de R-zinnen en S-zinnen niet te worden vermeld,

— als het preparaat is ingedeeld als ontvlambaar of gevaarlijk voor het milieu waarbij het symbool "N" niet is toegekend, moeten wel de R-zinnen maar niet noodzakelijk de S-zinnen worden vermeld.

7.1.2. Onverminderd het bepaalde in artikel 45., van het KB van 28 februari 1994 en het KB van 5 september 2001 mogen op het etiket en de verpakking van de stoffen en preparaten waarop dit besluit of het KB van 11 januari 1993 van toepassing is, geen aanduidingen voorkomen zoals "niet vergiftig", "onschadelijk", "niet verontreinigend", "milieuvriendelijk" of enige andere vermelding die aangeeft dat de stof of het preparaat ongevaarlijk is of die tot een onderschatting van de gevaren van de stof of het preparaat in kwestie zou kunnen leiden.

## 7.2. Op het etiket aan te brengen scheikundige benaming(en)

7.2.1. Voor de stoffen die in bijlage I zijn vermeld moet de naam van de stof op het etiket overeenkomen met een van de benamingen die in bijlage I voorkomen.

Voor stoffen die niet in bijlage I worden genoemd, wordt de benaming vastgesteld volgens de in punt 1.4 genoemde internationaal erkende chemische nomenclatuur.

7.2.2 Voor preparaten wordt bij de keuze van de benamingen die op het etiket moeten worden vermeld, de bepalingen van artikel 9, § 2, punt 2.3, van het KB van 11 januari 1993 gevolgd.

Nota :

Onverminderd het bepaalde in bijlage II, punt B.9, van het KB van 11 januari 1993,

— wordt de benaming van de sensibiliserende stof gekozen conform het bepaalde in punt 7.2.1 van deze bijlage;

— geldt voor geconcentreerde preparaten die bestemd zijn voor de parfumindustrie het volgende :

— de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen ervan hoeft alleen maar die sensibiliserende stof te identificeren die volgens hem in eerste instantie voor eventuele overgevoeligheid verantwoordelijk is;

— mag, wanneer het om een natuurlijke stof gaat, de chemische benaming van het type "etherische olie van..." of "extract van..." zijn en behoeven niet de namen van de bestanddelen van die vluchtige olie of van dat extract te worden genoemd.

### 7.3. Keuze van gevaarsymbolen

De gevaarsymbolen en -aanduidingen dienen overeen te stemmen met bijlage II. De symbolen moeten in zwart op een oranjegele achtergrond worden gedrukt.

7.3.1. Voor stoffen van bijlage I moeten de in die bijlage vermelde gevaarsymbolen en -aanduidingen worden gebruikt.

7.3.2. Voor gevaarlijke stoffen die nog niet in bijlage I zijn opgenomen en voor preparaten worden de gevaarsymbolen en -aanduidingen toegewezen volgens de regels van deze bijlage.

Indien aan een stof of preparaat meer dan één gevaarsymbool is toegewezen :

— maakt de verplichting symbool "E" aan te brengen het aanbrengen van de symbolen "F+", "F" en "O" facultatief.

— maakt de verplichting symbool "T+" of "T" aan te brengen het aanbrengen van de symbolen "Xn", "Xi" en "C" facultatief;

— maakt de verplichting symbool "C" aan te brengen het aanbrengen van de symbolen "Xn" en "Xi" facultatief;

— indien het symbool 'Xn' is toegewezen, is het symbool Xi' facultatief.

### 7.4. Keuze van R-zinnen

De tekst van de R-zinnen moet overeenkomen met die in bijlage III.

Indien van toepassing moeten de gecombineerde R-zinnen van bijlage III worden gebruikt.

7.4.1. Voor de stoffen van bijlage I zijn de R-zinnen die uit de bijlage.

7.4.2. Voor stoffen die niet in bijlage I zijn opgenomen, worden de R-zinnen gekozen overeenkomstig de volgende criteria en prioriteiten :

(a) in geval van gevaar voor de gezondheid :

(i) R-zinnen die overeenkomen met de gevaarscategorie die met een symbool wordt geïllustreerd - deze zinnen moeten op het etiket worden vermeld;

(ii) R-zinnen die overeenkomen met andere gevaarscategorieën die krachtens artikel 8, § 1 niet met een symbool worden geïllustreerd;

(b) in geval van gevaar als gevolg van fysisch-chemische eigenschappen :

— R-zinnen die overeenkomen met de gevaarscategorie die met een symbool wordt geïllustreerd - deze zinnen moeten op het etiket worden vermeld;

(c) in geval van gevaar voor het milieu :

— de R-zin(nen) die overeenkomt (overeenkomen) met de indelingscategorie "gevaarlijk voor het milieu" - deze zin(nen) moet(en) op het etiket worden vermeld.

7.4.3. Voor preparaten worden de R-zinnen gekozen overeenkomstig de volgende criteria en prioriteiten :

(a) in geval van gevaar voor de gezondheid :

(i) R-zinnen die overeenkomen met de gevaarscategorie die met een symbool wordt geïllustreerd. In bepaalde gevallen moeten de R-zinnen overeenkomstig de tabellen van bijlage I, deel B, deel 2 van het KB van 11 januari 1993 worden aangepast. Meer in het bijzonder moeten de R-zinnen van de component(en) die verantwoordelijk is/zijn voor het toekennen van een gevaarscategorie aan een preparaat op het etiket worden vermeld;

(ii) R-zinnen die overeenkomen met andere gevaarscategorieën die aan de componenten zijn toegekend maar die krachtens artikel 9, § 2, punt 2.4, van het KB van 11 januari 1993 niet met een symbool worden geïllustreerd.

(b) in geval van gevaar als gevolg van fysisch-chemische eigenschappen :

— de in punt 7.4.3, onder a), genoemde criteria zijn van toepassing, zij het dat de waarschuwingzinnen "zeer licht ontvlambaar" en "licht ontvlambaar" niet behoeven te worden aangebracht wanneer zij de tekst van de bij het symbool gebruikte gevaarsaanduiding herhalen;

(c) in geval van gevaar voor het milieu :

(i) de R-zin(nen) die overeenkomen met de indelingscategorie "gevaarlijk voor het milieu" - deze zin(nen) moet(en) op het etiket worden vermeld.

(ii) indien R-zin R50 is toegekend naast de gecombineerde R-zin R51/53 of R52/53 of R-zin R53 alléén, wordt de gecombineerde R-zin R50/53 gebruikt.

In het algemeen is voor preparaten een maximum van zes R-zinnen voldoende om het gevaar te beschrijven; hierbij worden de gecombineerde zinnen van bijlage III steeds als één zin beschouwd. De standaardzinnen moeten echter, indien het preparaat tot meer dan één gevaarscategorie behoort, in elk geval alle belangrijke gevaren bestrijken die aan het preparaat zijn verbonden. In sommige gevallen kunnen meer dan zes R-zinnen noodzakelijk zijn.

### 7.5. Veiligheidsaanbevelingen

De tekst van de S-zinnen moet overeenkomen met die in bijlage IV.

Indien van toepassing moeten de gecombineerde S-zinnen van bijlage IV worden gebruikt.

7.5.1. Voor de stoffen van bijlage I zijn de S-zinnen die uit de bijlage. Daar waar geen S-zinnen worden vermeld mag de fabrikant/importeur (een) geschikte S-zin(nen) opnemen. Voor stoffen die niet in bijlage I zijn opgenomen en voor preparaten gebruikt de fabrikant S-zinnen overeenkomstig de criteria van hoofdstuk 6 van deze bijlage.

### 7.5.2. Keuze van veiligheidsaanbevelingen

De uiteindelijke keuze van veiligheidsaanbevelingen moet zijn afgestemd op de op het etiket aangebrachte waarschuwingsszinnen en op het beoogde gebruik van de stof of het preparaat :

— in het algemeen is een maximum van zes S-zinnen voldoende om de meest geschikte veiligheidsaanbeveling te formuleren; hierbij worden de gecombineerde zinnen van bijlage IV steeds als één zin beschouwd;

— in geval van S-zinnen met betrekking tot verwijdering moet één S-zin worden gebruikt, tenzij duidelijk is dat verwijdering van de stof en de verpakking geen gevaar voor de gezondheid van de mens of het milieu inhoudt. Met name is advies over een veilige verwijdering van belang voor stoffen en preparaten die aan het grote publiek worden verkocht;

— bepaalde R-zinnen worden overbodig indien een zorgvuldige selectie van S-zinnen wordt gemaakt en vice versa; S-zinnen die duidelijk overeenkomen met R-zinnen worden alleen op het etiket vermeld als het de bedoeling is de nadruk op een bepaalde waarschuwing te leggen;

— bijzondere aandacht bij de keuze van veiligheidsaanbevelingen moet worden geschonken aan de verwachte gebruiksomstandigheden van bepaalde stoffen en preparaten, bijvoorbeeld sproeien of andere aërosol-effecten. Bij de keuze van de zinnen moet op het beoogde gebruik worden gelet;

— de veiligheidsaanbevelingen S1, S2 en S45 zijn verplicht voor alle zeer vergiftige, vergiftige en bijtende stoffen en preparaten die aan het grote publiek worden verkocht;

— de veiligheidsaanbevelingen S2 en S46 zijn verplicht voor alle andere gevaarlijke stoffen en preparaten die aan het grote publiek worden verkocht, met uitzondering van degene die uitsluitend als "gevaarlijk voor het milieu" zijn ingedeeld.

Als sommige aanbevelingen die volgens de strikte criteria van punt 6.2 zijn gekozen, overbodig, dubbelzinnig of duidelijk onnodig zijn gezien het specifieke product of de specifieke verpakking, kunnen zij worden weggelaten.

### 7.6. Het EG-nummer

Als een op het etiket genoemde stof is opgenomen in de Europese inventaris van bestaande chemische handelstoffen (Einecs) of in de Europese lijst van bekendgemaakte stoffen (Elincs), moet het Einecs- of Elincs-nummer van de stof op het etiket worden vermeld. Deze vereiste geldt niet voor preparaten.

### 7.7. Afmetingen van het etiket voor preparaten

De afmetingen van het etiket zijn als volgt :

Inhoud van de verpakking	Afmetingen (in millimeter)
— niet meer dan 3 liter :	zo mogelijk ten minste 52 x 74
— meer dan 3 liter maar niet meer dan 50 liter :	ten minste 74 x 105
— meer dan 50 liter maar niet meer dan 500 liter :	ten minste 105 x 148
— meer dan 500 liter	ten minste 148 x 210

Elk symbool dient ten minste een tiende van de oppervlakte van het etiket en niet minder dan 1cm<sup>2</sup> te beslaan. Het etiket moet duurzaam op één of meer oppervlakken van de directe verpakking van het preparaat worden bevestigd.

De verplicht op het etiket aan te brengen gegevens dienen duidelijk tegen de achtergrond af te steken en de grootte en spatiering dienen zo te worden gekozen dat zij gemakkelijk leesbaar zijn.

## 8. SPECIALE GEVALLEN : STOFFEN

### 8.1. Mobiele gascilinders

Voor mobiele gascilinders geldt dat aan de etiketteringseisen geacht wordt te zijn voldaan wanneer zij in overeenstemming zijn met artikel 8, § 1 of artikel 8, § 2, 6°, onder b).

In afwijking van artikel 8, § 2, 1° en 2°, kan bij gascilinders met een watercapaciteit van 150 liter of minder één van de volgende alternatieven worden gebruikt :

— de opmaak en de afmetingen van het etiket kunnen voldoen aan de voorschriften van ISO-norm ISO/DP 7225 (editie 1994) inzake Gas cylinders - Precautionary labels;

— de in artikel 8, § 1, 1°, gespecificeerde informatie mag worden verstrekt op een duurzaam op de cilinder aangebracht informatieschijfje of -plaatje.

### 8.2. Gascilinders bedoeld voor propaan, butaan of vloeibaar petroleumgas (LPG)

Deze stoffen zijn ingedeeld in bijlage I. Hoewel zij zijn ingedeeld overeenkomstig artikel 1, § 4, vormen zij geen gevaar voor de volksgezondheid wanneer zij als brandstof in gesloten navulbare cilinders of in niet-navulbare gashouders in de zin van EN 417 op de markt worden gebracht, waarbij zij alleen vrijkomen voor verbranding (EN 417, editie van september 1992, inzake Non-refillable metallic gas cartridges for liquefied petroleum gases, with or without a valve, for use with portable appliances; construction, inspection, testing and marking').

Deze cilinders of gashouders moeten worden gekenmerkt met het passende symbool en de R- en S-zinnen voor ontvlambaarheid. Op het etiket behoeft geen informatie over de effecten op de gezondheid van de mens te worden vermeld. De informatie over de effecten op de gezondheid van de mens die op het etiket zou moeten hebben gestaan, dient evenwel door de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van de stof in de in artikel 9, § 2 omschreven vorm aan de professionele gebruiker te worden verstrekt. Aan de consument moet voldoende informatie worden verstrekt om hem in staat te stellen alle in artikel 12, § 2, punt 2. 3, van het KB van 11 januari 1993, omschreven maatregelen ter bescherming van de veiligheid en de gezondheid te nemen.

### 8.3. Metalen in massieve vorm

Deze stoffen zijn ingedeeld in bijlage I of worden in overeenstemming met artikel 3, § 4 ingedeeld. Enkele van deze stoffen vormen echter, hoewel ze zijn ingedeeld overeenkomstig artikel 1, § 4, in de vorm waarin ze in de handel worden gebracht geen gevaar voor de gezondheid van de mens bij inademing, opname door de mond of aanraking met de huid en geen gevaar voor het aquatisch milieu. Voor dergelijke stoffen is op grond van artikel 8, § 1 geen etiket vereist. Alle informatie die op het etiket zou moeten hebben gestaan, dient evenwel door de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van het metaal in de in artikel 9, § 2 omschreven vorm aan de gebruiker te worden verstrekt.

### 8.4. Stoffen waaraan zin R65 is toegekend

Stoffen die op basis van gevaar bij inslikken als schadelijk zijn ingedeeld, behoeven niet met waarschuwingsszin R65 te worden gekenmerkt wanneer zij in spuitbussen of houders met een vaste verstuiver op de markt worden gebracht.



## 9. SPECIALE GEVALLEN : PREPARATEN

## 9.1. Gasvormige preparaten (gasmengsels)

Bij gasvormige preparaten moet aandacht worden geschonken aan :

- de beoordeling van de fysisch-chemische eigenschappen;
- de beoordeling van de gevaren voor de gezondheid;
- de beoordeling van de gevaren voor het milieu.

## 9.1.1. Beoordeling van de fysisch-chemische eigenschappen

## 9.1.1.1. Ontvlambaarheid

De ontvlambaarheidseigenschappen van deze preparaten worden vastgesteld overeenkomstig artikel 5, § 1 van het KB van 11 januari 1993 volgens de in bijlage V, van dit besluit vermelde methoden.

Deze preparaten worden ingedeeld op basis van de resultaten van de uitgevoerde tests, de criteria van bijlage V en de criteria in de handleiding voor de etikettering.

In afwijking hiervan kan, wanneer het gaat om gasvormige preparaten die in kleine hoeveelheden op bestelling worden vervaardigd, de ontvlambaarheid van deze gasmengsels met de volgende berekeningsmethode worden beoordeeld :

de wiskundige uitdrukking voor het gasmengsel :

$$A_1 F_1 + \dots + A_n F_n + B_1 I_1 + \dots + B_p I_p$$

Waarin :  $A_i$  en  $B_i$  de molaire fracties zijn,

$F_i$  de hoeveelheid ontvlambaar gas is,

$I_i$  de hoeveelheid inert gas is,

$n$  het aantal ontvlambare gassen is,

$p$  het aantal inerte gassen is,

kan door het gebruik van een coëfficiënt  $K_i$  worden omgezet in een vorm waarin al de  $I_i$  (inerte gassen) worden uitgedrukt in een stikstofequivalent en waarin de equivalente hoeveelheid ontvlambaar gas  $A'_i$  als volgt wordt uitgedrukt :

$$A'_i = A_i \times (100 / (A_i + K_i B_i))$$

Door gebruikmaking van de waarde van de maximale hoeveelheid ontvlambaar gas dat in een mengsel met stikstof een samenstelling geeft die niet aan de lucht ontvlambaar is ( $T_{ci}$ ), kan de volgende formule worden verkregen :

$$\sum_i A'_i / T_{ci} \leq 1$$

Het gasmengsel is ontvlambaar indien de waarde in bovenstaande formule groter is dan 1. Het preparaat wordt als zeer licht ontvlambaar ingedeeld en krijgt de waarschuwingszin R12 toegekend.

Equivalentiecoëfficiënten ( $K_i$ )

De waarden van de equivalentiecoëfficiënten ( $K_i$ ) tussen de inerte gassen en stikstof en de waarden van de maximale hoeveelheid ontvlambaar gas ( $T_{ci}$ ) kunnen worden gevonden in de tabellen 1 en 2 van ISO-norm ISO 10156, editie van 15.12.1990 (nieuwe editie : 1996) inzake Gases and gas mixtures - Determination of fire potential and oxidising ability for the selection of cylinder valve outlets'.

Maximale hoeveelheid ontvlambaar gas ( $T_{ci}$ )

De waarde van de maximale hoeveelheid ontvlambaar gas ( $T_{ci}$ ) kan worden gevonden in tabel 2 van ISO-norm ISO 10156, editie van 15.12.1990 (nieuwe editie : 1996) inzake Gases and gas mixtures - Determination of fire potential and oxidising ability for the selection of cylinder valve outlets'.

Wanneer in bovengenoemde tabel een  $T_{ci}$ -waarde van een ontvlambaar gas niet voorkomt, moet de bijbehorende lagere explosiviteitslimiet (LEL) worden gebruikt. Als geen LEL-waarde bestaat, wordt de waarde van  $T_{ci}$  gesteld op 1 volumeprocent.

## Opmerkingen

— Bovengenoemde formule kan worden gebruikt voor een passende etikettering van gasvormige preparaten doch dient niet te worden gezien als een methode ter vervanging van proefnemingen voor de bepaling van technische veiligheidsparameters.

— Bovendien wordt middels deze formule geen informatie gegeven in hoeverre een mengsel dat oxiderende gassen bevat, veilig kan worden vervaardigd. Bij de berekening van de ontvlambaarheid worden deze oxiderende gassen niet in beschouwing genomen.

— Bovenstaande formule levert alleen betrouwbare resultaten op als de ontvlambare gassen elkaar qua ontvlambaarheid niet beïnvloeden. Hiermee dient rekening te worden gehouden bij bijvoorbeeld gehalogeneerde koolwaterstoffen.

## 9.1.1.2. Oxiderende eigenschappen

Aangezien bijlage V van dit besluit geen methode voor de bepaling van de oxiderende eigenschappen van gasmengsels bevat, moet de beoordeling van deze eigenschappen overeenkomstig de volgende schattingsmethode geschieden.

Het uitgangspunt van de methode is het vergelijken van het oxiderend vermogen van gassen in een mengsel met het oxiderend vermogen van zuurstof in de lucht. De concentraties van gassen in het mengsel worden uitgedrukt in volumeprocent.

Men gaat ervan uit dat het gasmengsel even of sterker oxiderend is dan lucht, wanneer aan de volgende voorwaarde is voldaan :

$$\sum_i x_i C_i \geq 21$$

waarin :  $x_i$  de concentratie van gas  $i$  in volumeprocent is, en

$C_i$  de zuurstofequivalentiecoëfficiënt is.

In dit geval wordt het preparaat als oxiderend ingedeeld en krijgt het de zin R8 toegekend.



Equivalentiecoëfficiënten tussen oxiderende gassen en zuurstof

De coëfficiënten die worden gebruikt in de berekening ter bepaling van het oxiderend vermogen van bepaalde gassen in een mengsel ten opzichte van het oxiderend vermogen van zuurstof in de lucht, opgenomen onder punt 5.2 in de ISO-norm ISO 10156, editie van 15.12.1990 (nieuwe editie : 1996) inzake Gases and gas mixtures - Determination of fire potential and oxidising ability for the selection of cylinder valve outlets', zijn de volgende :

O <sub>2</sub>	1
N <sub>2</sub> O	0,6

Wanneer in genoemde norm voor een gas geen C<sub>i</sub>-coëfficiënt wordt opgegeven, wordt aan deze coëfficiënt de waarde 40 toegekend.

#### 9.1.2. Etikettering

Voor mobiele gascilinders geldt dat aan de etiketteringseisen geacht wordt te zijn voldaan wanneer zij in overeenstemming zijn met artikel 10, § 6, b), van het KB van 11 januari 1993.

In afwijking van artikel 10, § 1 en § 2, kunnen bij gascilinders met een watercapaciteit van 150 liter of minder de opmaak en de afmetingen van het etiket voldoen aan de voorschriften van ISO-norm ISO 7225 (editie 1994) inzake Gas cylinders - Precautionary labels'. In dit geval mag het etiket de gangbare benaming of industriële/handelsbenaming van het preparaat dragen, vooropgesteld dat de namen van de gevaarlijke stoffen in het preparaat duidelijk en onuitwisbaar op de buitenkant van de gascilinder worden vermeld.

De in artikel 9 gespecificeerde informatie mag worden verstrekt op een duurzaam op de cilinder aangebracht informatieschijfje of -plaatje.

#### 9.2. Gascilinders bedoeld voor preparaten die propaan, butaan of vloeibaar petroleumgas (LPG) bevatten waaraan een stinkende stof is toegevoegd

Propaan, butaan en vloeibaar petroleumgas (LPG) zijn ingedeeld in bijlage I. Hoewel de preparaten die deze stoffen bevatten zijn ingedeeld overeenkomstig de art 5, § 1, § 2 en § 3 van het KB van 11 januari 1993, vormen zij geen gevaar voor de volksgezondheid wanneer zij als brandstof in gesloten navulbare cilinders of in niet-navulbare gashouders in de zin van EN 417 op de markt worden gebracht, waarbij zij alleen vrijkomen voor verbranding (EN 417, editie van september 1992, inzake Non-refillable metallic gas cartridges for liquefied petroleum gases, with or without a valve, for use with portable appliances; construction, inspection, testing and marking").

Deze cilinders en gashouders moeten worden gekenmerkt met het passende symbool en de R- en S-zinnen voor ontvlambaarheid. Op het etiket behoeft geen informatie over de effecten op de gezondheid van de mens te worden vermeld. De informatie over de effecten op de gezondheid van de mens die op het etiket zou moeten hebben gestaan, dient evenwel door de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van de stof in de in artikel 12 van het KB van 11 januari 1993 omschreven vorm aan de professionele gebruiker te worden verstrekt. Aan de consument moet voldoende informatie worden verstrekt om hem in staat te stellen alle in artikel 12, § 2, punt 2.3, van het KB van 11 januari 1993 omschreven maatregelen ter bescherming van de veiligheid en de gezondheid te nemen.

#### 9.3. Legeringen, preparaten die polymeren bevatten, preparaten die elastomeren bevatten

Deze preparaten worden ingedeeld in overeenstemming met de bepalingen van de art 5, §1, § 2 en § 3 en geëtiketteerd overeenkomstig de bepalingen van artikel 9 van het KB van 11 januari 1993.

Enkele van deze preparaten vormen echter, hoewel ze zijn ingedeeld overeenkomstig de art 5, § 2 en § 3 in de vorm waarin ze in de handel worden gebracht geen gevaar voor de gezondheid van de mens bij inademing, opname door de mond of aanraking met de huid en geen gevaar voor het aquatisch milieu. Voor dergelijke stoffen is op grond van artikel 9 of bijlage II, punt B.9, geen etiket vereist. Alle informatie die op het etiket zou moeten hebben gestaan, dient evenwel door de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van het preparaat door middel van een informatiesysteem in de in artikel 12 van bovengenoemde besluit omschreven vorm aan de professionele gebruiker te worden verstrekt.

#### 9.4. Preparaten waaraan zin R65 is toegekend

Preparaten die op basis van inademingsgevaar als schadelijk zijn ingedeeld, behoeven niet met waarschuwingzin R65 te worden gekenmerkt wanneer zij in spuitbussen of houders met een vaste verstuiver op de markt worden gebracht.

#### 9.5. Organische peroxiden

Organische peroxiden combineren de eigenschappen van een oxiderende en een brandbare stof in één molecuul : wanneer een organisch peroxide uiteenvalt, reageert het oxiderende deel van het molecuul exotherm met het brandbare (oxideerbare) deel. De bestaande methoden van bijlage V kunnen niet op organische peroxiden worden toegepast om de oxiderende eigenschappen ervan te bepalen.

De volgende op de aanwezigheid van actieve zuurstof gebaseerde methode moet worden gebruikt.

Het beschikbare zuurstofgehalte (%) van een organisch peroxidepreparaat wordt gegeven door de formule :

$$16 \times \sum (n_i \times c_i / m_i)$$

waarin :

$n_i$  = het aantal peroxigroepen per molecuul organisch peroxide  $i$  is;

$c_i$  = de concentratie (massaprocent) van organisch peroxide  $i$  is; en

$m_i$  = de molecuulmassa van organisch peroxide  $i$  is.

#### 9.6. Aanvullende etiketteringseisen voor bepaalde preparaten

Voor bepaalde preparaten gelden aanvullende etiketteringseisen als omschreven in artikel 9, § 1, punt 1.2, en bijlage II van het KB van 11 januari 1993 en artikel 40 van het KB van 5 september 2001.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

## Bijlage IIIA

Voor tussenproducten met een beperkte blootstelling zijn de bepalingen van punt 7 van toepassing.  
Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

## ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

## Bijlage IIIB

**7. Beperkt testpakket voor tussenproducten bij hoeveelheden = 1 ton/jaar**

## 1. Definities

Onverminderd de bepalingen in andere reglementeringen die uitgevoerd zijn op basis van andere communautaire wetgeving moet in de bijlagen III<sub>A</sub>, III<sub>B</sub>, IV<sub>A</sub> en IV<sub>B</sub> worden verstaan onder :

— "tussenproduct" : een chemische stof die uitsluitend geproduceerd wordt voor en verbruikt wordt in of gebruikt wordt voor een chemische reactie om omgezet te worden in andere chemische stoffen;

— "emissie" : het vrijkomen van een stof uit een systeem, bijvoorbeeld wanneer er een lek in dit systeem ontstaat. Om een optimaal beschermingsniveau voor werknemers en het milieu te waarborgen moet derhalve een minimale emissie door een strikte inperking van het proces de eerste doelstelling zijn;

— "blootstelling" : hetgeen gebeurt na de emissie van een stof, ongeacht of dit gebeurt in het milieu in ruimere zin of de mogelijkheid bestaat dat de stof wordt ingeademd door of in aanraking komt met de huid van een personeelslid. Als een emissie kan worden verwacht, moet met behulp van adequate technieken voor een strikte blootstellingscontrole worden gezorgd, waarbij het voorzorgbeginsel dient te worden gehanteerd hetgeen inhoudt dat fysisch-chemische, toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen die niet zijn getest, als gevaarlijk worden beschouwd;

— "geïntegreerd afzuigventilatiesysteem" : een afzuigventilatiesysteem van het gesloten type dat in combinatie met sloten, omhullingen, behuizingen, houders enz. wordt gebruikt om de chemische stoffen in het binnenste gedeelte van de gesloten functionele eenheid te houden. Openingen voor het proces moeten zo klein mogelijk zijn.

De zuigkracht en de luchtgeleiding moeten zodanig zijn ontworpen dat er binnen het afzuigstelsel voldoende onderdruk is om ervoor te zorgen dat alle gassen, dampen en/of stofdeeltjes die ontstaan volledig worden opgevangen en afgevoerd. Terugstroming van afgezogen gevaarlijke stoffen naar het werkgebied moet worden voorkomen.

Dit betekent dat wordt voorkomen dat gevaarlijke stoffen vanuit de gesloten functionele eenheid naar het werkgebied ontsnappen.

— "zeer effectief afzuigventilatiesysteem" : een afzuigventilatiesysteem van het open of semi-open type dat zodanig is opgezet dat chemische stoffen binnen het afzuiggebied blijven. Dit betekent dat praktisch kan worden uitgesloten dat chemische stoffen in het werkgebied in de lucht voorkomen;

— "effectief afzuigventilatiesysteem" : een afzuigventilatiesysteem van het open of semi-open type dat zodanig is opgezet dat chemische stoffen binnen het afzuiggebied blijven, hetgeen betekent dat grotendeels kan worden uitgesloten dat chemische stoffen in het werkgebied in de lucht voorkomen of dat is aangetoond dat de grenswaarde in acht wordt genomen;

— "ander afzuigventilatiesysteem" : een afzuigventilatiesysteem van het open of semi-open type dat zodanig is opgezet dat niet kan worden uitgesloten dat chemische stoffen in het werkgebied in de lucht voorkomen;

— "gebruiksvormen met een lage emissie" : bijvoorbeeld :

— eenmalige verpakking, hetgeen inhoudt dat de gevaarlijke stof zich in een geschikte verpakking bevindt en zonder de verpakking te openen samen met deze verpakking in een reactiesysteem wordt gebracht;

— verandering in consistentie, hetgeen inhoudt dat de stof bijvoorbeeld in plaats van in poedervorm in de vorm van een pasta of granulaat wordt gebruikt;

— "masterbatches", hetgeen inhoudt dat de gevaarlijke stof in een kunststofmatrix is verpakt waardoor direct contact met de gevaarlijke stof wordt voorkomen. De kunststofmatrix is zelf geen gevaarlijke stof. Afschuring van de kunststofmatrix en derhalve de gevaarlijke stof is echter mogelijk;

— "emissievrije gebruiksvormen" : bijvoorbeeld slijtvaste masterbatches hetgeen inhoudt dat de kunststofmatrix zo slijtvast is dat er geen gevaarlijke stoffen kunnen vrijkomen;

— "technisch lekdicht" : geldt voor een subeenheid als er geen lek kan worden geconstateerd bij het testen, meten of controleren op lekdichtheid, bijv met schuimvormers of voor de toepassing specifieke apparatuur voor het zoeken/constateren van lekken. Systemen, subsystemen en functionele onderdelen zijn technisch lekdicht als de lekkagesnelheid lager dan  $0,00001 \text{ mbar} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$  is.

## 2. Verzoek voor een beperkt testpakket

Voor tussenproducten kan de kennisgever de Minister om toestemming vragen voor de toepassing van een beperkt testpakket (BTP). Dit BTP vormt een minimaal gegevenspakket voor de opstelling van een eerste voorlopige risicobeoordeling voor chemische tussenproducten die in de handel worden gebracht. Overeenkomstig artikel 5, § 2, II, kunnen op basis van de resultaten van de risicobeoordeling aanvullende testresultaten worden vereist.

### 3. Voorwaarden voor de toepassing van een beperkt testpakket

De kennisgever moet tot genoegen van de Minister, aantonen dat aan de volgende voorwaarden wordt voldaan :

a) de stof wordt uitsluitend vervaardigd voor en verbruikt bij of gebruikt voor chemische processen. Monomeren worden uitgesloten. Bij dit proces wordt de stof omgezet in chemisch verschillende moleculen die geen polymeren zijn.;

b) de stof mag op maximaal twee locaties worden gebruikt. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat de stof door één bedrijf wordt vervaardigd en vervolgens naar een of twee andere bedrijven wordt vervoerd om te worden verwerkt. Als het voornemen bestaat de levering tot meer dan twee locaties uit te breiden, wordt niet meer aan de voorwaarden voor een BTP voldaan en moet het dossier worden uitgebreid;

c) de stof moet door de kennisgever rechtstreeks en niet via een tussenhandelaar worden geleverd aan het bedrijf dat het tussenproduct voor verdere verwerking gebruikt;

d) de stof moet tijdens zijn hele levenscyclus met technische middelen strikt worden ingeperkt. Hierbij gaat het om productie, vervoer, zuivering, reiniging en onderhoud, bemonstering, analyse, laden en lossen van apparatuur/houders, verwijdering/zuivering van afval en opslag. In het algemeen dient bij een geschikt proces de constructie van alle functionele onderdelen van de installatie zoals vulopeningen en aftapinstallaties van het gesloten type met gegarandeerde lekdichtheid of van het gesloten type met geïntegreerd afzuigventilatiesysteem te zijn;

e) wanneer de mogelijkheid van blootstelling bestaat, moet er procedure- en controletechnologie worden gebruikt waardoor de emissie en daaruit voortvloeiende blootstelling tot een minimum worden beperkt;

f) bij reinigings- en onderhoudswerkzaamheden moeten er speciale procedures als ontluchten en spoelen worden gebruikt alvorens het systeem wordt geopend of betreden;

g) bij het vervoer dient te worden voldaan aan de voorschriften van het koninklijk besluit van 12 november 1998 betreffende het vervoer van gevaarlijke goederen over de weg met uitzondering van ontplofbare en radioactieve stoffen.

h) bij ongevallen en wanneer na zuivering of reinigings- en onderhoudsprocedures afval ontstaat, kan blootstelling van het milieu plaatsvinden. In deze gevallen moeten er procedure- en/of controletechnologieën worden gebruikt waardoor de emissie en daaruit voortvloeiende blootstelling tot een minimum worden beperkt;

i) er moet een beheersysteem bestaan waarin de rol van de personen in de organisatie worden beschreven;

j) de verpakking van de stof wordt overeenkomstig bijlage VI van het KB van 24 mei 1982 geëtiketteerd en daarnaast voorzien van de volgende zin : "Voorzichtig – deze stof is nog niet volledig getest";

k) de kennisgever moet een systeem voor "product stewardship" toepassen, en de gebruikers (maximaal twee) controleren om ervoor te zorgen dat aan bovengenoemde voorwaarden wordt voldaan.

### 4. Technisch dossier dat voor een beperkt testpakket moet worden ingediend

Een kennisgever die voor een stof een BTP aanvraagt, moet voor alle productie- en gebruikslocaties het volgende technische dossier bij de Minister indienen :

a) een verklaring dat de kennisgever en iedere gebruiker de onder punt 3 vermelde voorwaarden accepteert;

b) een beschrijving van de technische maatregelen waardoor een strikte inperking van de stof wordt verwezenlijkt (1), met inbegrip van de procedures voor belading, monsterneming, vervoer en reiniging. Er hoeft geen gedetailleerde informatie te worden verstrekt over de volledigheid van elke afdichting of de efficiëntie van elk geïntegreerd afzuigventilatiesysteem. Het is echter wel belangrijk dat voor alle middelen die voor de verwezenlijking van een strikte inperking van het proces worden toegepast, indien nodig informatie beschikbaar is om te controleren of de beweringen omtrent de verwezenlijking van controle correct zijn;

c) als niet aan de in punt 5 beschreven criteria voor de evaluatie van gesloten systemen bij de verwerking van chemische stoffen wordt voldaan, moet de kennisgever blootstellingsgegevens indienen op basis van representatieve meetgegevens en/of betrouwbare modelberekeningen om de Minister in staat te stellen te beslissen of een BTP-verzoek al dan niet wordt ingewilligd;

d) een gedetailleerde beschrijving van de processen op alle locaties die bij productie en gebruik betrokken zijn. Met name moet worden vermeld of het productie- en/of verwerkingsafval in het afvalwater wordt geloosd, of vast of vloeibaar afval wordt verbrand en hoe de reiniging en het onderhoud van alle apparatuur gebeuren;

e) een gedetailleerde evaluatie van de mogelijke emissie en de mogelijke blootstelling van mens en milieu tijdens de volledige levenscyclus, met inbegrip van gedetailleerde informatie over de verschillende bij het proces betrokken chemische reacties en de manieren waarop resten worden verwerkt.

Wanneer de emissie tot blootstelling kan leiden, moeten de manieren waarop deze onder controle wordt gehouden voldoende gedetailleerd worden beschreven om de Minister in staat te stellen te beslissen of zij de verklaring accepteert of aan de hand van het EU-document met technische richtsnoeren een emissievoet zal berekenen;

f) veranderingen die de blootstelling van mens en milieu kunnen beïnvloeden, zoals veranderingen in de functionele onderdelen van de installatie, een nieuwe gebruiker of een nieuwe locatie, moeten vooraf worden aangemeld;

g) voor het BTP wordt de volgende informatie voorgeschreven :

bijlage VII B plus de volgende tests uit de onderhavige bijlage :

- dampspanning (3.4),
- ontploffingsgevaar (3.11),
- zelfontbrandingstemperatuur (3.12),
- oxiderende eigenschappen (3.13),
- korrelgrootte (3.15),
- acute toxiciteit voor daphnia (5.1.2).

De kennisgever moet tevens andere relevante informatie verstrekken om ervoor te zorgen dat de Minister met kennis van zaken een beslissing kan nemen en de gebruiker op de verwerkingslocatie afdoende controlemaatregelen kan nemen. Als er bijvoorbeeld aanvullende fysisch-chemische informatie en/of toxicologische informatie en/of informatie over het gedrag van de stof in het milieu beschikbaar is, moeten deze gegevens ook worden ingediend. Daarnaast moet de kennisgever de beschikbare gegevens over toxiciteit en ecotoxiciteit evalueren voor stoffen die structureel nauw verwant zijn met de aangemelde stof. Als er relevante gegevens beschikbaar zijn, met name over chronische en voortplantingstoxiciteit en carcinogene werking, moet een overzicht van deze gegevens worden verstrekt;

h) de identiteit van de kennisgever, de producent en de gebruiker(s).

## 5. Criteria voor de evaluatie van gesloten systemen bij de verwerking van chemische stoffen

### 5.1. Gebruik

Bij de evaluatie van de installatie wordt een evaluatie-index gebruikt. Met de evaluatie-index worden de verwerking van de stof en het daaruit voortvloeiende procesgebonden blootstellingspotentieel ingedeeld. De kennisgever onderzoekt de installatie of de installatie-eenheid teneinde de evaluatie-index te bepalen. Elk afzonderlijk functioneel onderdeel moet worden geëvalueerd.

Systemen worden als gesloten beschouwd als de evaluatie van alle beschikbare functionele onderdelen tot een evaluatie-index 0,5 leidt en als alleen functionele onderdelen van het gesloten type met gegarandeerde lekdichtheid en/of voorzien van een geïntegreerd afzuigventilatiesysteem betrokken zijn. Bovendien moet direct contact met de huid uitgesloten zijn.

In de verzameling voorbeelden is aan de desbetreffende functionele onderdelen de evaluatie-index 0,5 (vet gedrukt) toegekend.

Functionele onderdelen van het gedeeltelijk open type met een zeer effectief afzuigventilatiesysteem (waaraan ook de evaluatie-index 0,5 is toegekend maar in normaal lettertype) worden niet als gesloten in de zin van deze regel beschouwd.

Bij functionele onderdelen waaraan de evaluatie-index 1 is toegekend, is de veilige inachtneming van de grenswaarden niet altijd permanent gewaarborgd. Dergelijke functionele onderdelen zijn :

- 1 - gesloten type, lekdichtheid niet gegarandeerd,
- 1 - gedeeltelijk open type met een effectief afzuigventilatiesysteem.

Bij functionele onderdelen waaraan de evaluatie-index 2 of 4 is toegekend, is de inachtneming van de grenswaarden niet altijd gewaarborgd. Dergelijke functionele onderdelen zijn :

- 2 - gedeeltelijk open type, opening zoals bedoeld met een eenvoudig afzuigventilatiesysteem,
- 2 - open type met een eenvoudig afzuigventilatiesysteem,
- 4 - open type of gedeeltelijk open type,
- 4 - natuurlijke ventilatie.

De verzameling voorbeelden in tabel 1 vergemakkelijkt de indeling van functionele onderdelen. Functionele onderdelen die niet in de verzameling voorbeelden zijn opgenomen, kunnen naar analogie met andere onderdelen worden ingedeeld. De installatie of installatie-eenheid wordt vervolgens ingedeeld volgens de evaluatie-index van het functionele onderdeel dat de hoogste evaluatie-index heeft gekregen.

### 5.2 Controle

Het gebruik van dit criterium vereist dat de vastgestelde procesparameters in acht worden genomen en dat de in de verzameling voorbeelden genoemde controles (bijv keuring en onderhoud) worden uitgevoerd.

## 6. Toepassing van een beperkt testpakket

Als de Minister het verzoek van de kennisgever voor een BTP inwilligt, is informatie over de onder punt 7.4 vermelde tests en/of onderzoeken nodig voor het in artikel 2, § 1 bedoelde technische dossier. Hierbij dient te worden opgemerkt dat voor hoeveelheden van minder dan 1 ton/jaar de gebruikelijke testvoorschriften van bijlage VII B/bijlage VII C gelden.

### Nota's

(1) De aard van de constructie en de technische specificaties (bijv lekdichtheid) van het gesloten functionele onderdeel zijn bepalend voor de effectiviteit van de inperking. Om de bevoegde instantie in staat te stellen te bepalen of een strikte inperking al dan niet verwezenlijkt is, is het van essentieel belang dat de kennisgever hierover gedetailleerde informatie verstrekt. De technische maatregelen moeten normaal gesproken voldoen aan de voorwaarden van de "Criteria voor de evaluatie van gesloten systemen bij de verwerking van chemische stoffen" die als leidraad zijn opgenomen in punt 7.5 en tabel 1. Dit moet door de kennisgever worden verklaard, maar het is niet nodig dat in de beschrijving van de technische maatregelen elk soort gesloten functioneel onderdeel aan de orde komt. Afwijkingen van de voorwaarden van de criteria moeten volledig en met een motivering worden beschreven.

Tabel 1  
Verzameling voorbeelden

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index met aanvullende maatregelen		Toelichting
				zonder	6	
1	2	3	4	5	6	7
1.1	statische afdichtingen statische afdichtingen	niet-demonteerbare koppelingen	<ul style="list-style-type: none"> <li>— gelast</li> <li>— gesoldeerd</li> </ul>	0,5 0,5		<ul style="list-style-type: none"> <li>— beperkt koppelingen tot vereiste aantal</li> <li>— open koppelingen zo weinig mogelijk</li> </ul>
1.2	statische afdichtingen	demonteerbare koppelingen	<ul style="list-style-type: none"> <li>— afdichting met gelaste lip</li> <li>— koppeling met snijring en knelring <math>\leq</math> DN 32</li> <li>— NPT-schroefdraad <math>\leq</math> DN 50, <math>\Delta t \leq 100^\circ\text{C}</math></li> <li>— — koppeling met snijring en knelring <math>&gt;</math> DN 32</li> <li>— NPT-schroefdraad <math>&gt;</math> DN 50, <math>\Delta t &gt; 100^\circ\text{C}</math></li> <li>— flens met mes en groef met geschikte afdichting</li> <li>— flens met uitsteeksel en holte met geschikte afdichting</li> <li>— flens met V-groef en geschikte afdichting voor V-groef</li> <li>— flens met gladde afdichtingsgeleider met geschikte afdichting</li> </ul>	0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 1 1 1 1 1 1 1	<p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling*</p> <p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling *</p> <p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling*</p> <p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling*</p> <p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling*</p> <p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling*</p> <p>0,5 Waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling*</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— lekkagetests vóór opnieuw in bedrijf nemen</li> <li>— gebruik nieuwe afdichtingen bij opnieuw in bedrijf nemen wanneer de koppelingen gedemonstreerd zijn</li> <li>— waar mogelijk dienen de flenzen die om operationele redenen worden geopend, niet met mes en groef te worden uitgerust (gevaar van verkeerde uitlijning)</li> </ul>
1.3	quasi-statische afdichtingen		<ul style="list-style-type: none"> <li>— pakkingbus-afdichtingen</li> </ul>	2	1 bij geregelde controle en herstelling	
1.3.1	fittingen	schacht- en asafdichtingen van fittingen, bijv kogelventielen, stopkranen, kleppen, vlinderkleppen, schuifkleppen	<ul style="list-style-type: none"> <li>— pakkingbus-afdichtingen met zelf-aanpassing (met veerspanning)</li> <li>— dubbele pakkingbus-afdichting met stop</li> <li>— afdichting met O-ring</li> <li>— stopkraan met voering</li> <li>— zuigerafdichting</li> <li>— balgafdichting</li> </ul>	1 1 1 1 1 0,5	<p>0,5 technisch lekdicht</p> <p>0,5 met controle op het stopdruksysteem</p> <p>0,5 technisch lekdicht</p> <p>0,5 waarborging van technische lekdichtheid door controle en herstelling</p> <p>0,5 technisch lekdicht</p>	<p>door middel van geregelde visuele controles of apparatuur voor procescontrole-technologie</p>



Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index met aanvullende maatregelen		Toelichting	
				zonder			
1	2	3	4	5	6	7	
1.3.2	Andere	bedieningsstaven	<ul style="list-style-type: none"> <li>— membraanafdichting</li> <li>— magnetische koppeling</li> <li>— pakkingbus-afdichtingen</li> <li>— pakkingbus-afdichtingen met zelf-aanpassing (met veerspanning)</li> <li>— dubbele pakkingbus-afdichting met stop</li> <li>— afdichting met O-ring</li> <li>— zuigerafdichting</li> <li>— balgafdichting</li> <li>— membraanafdichting</li> <li>— ingeblikte motor</li> <li>— magnetische koppelingen</li> <li>— afdichting met één axiale zijde</li> <li>— afdichting met twee axiale zijden</li> <li>— afdichting met twee axiale zijden met stopvloeistof</li> </ul>	<p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>2</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>2</p> <p>2</p> <p>1</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>1</p> <p>1</p>	<p>1 bij geregelde controle en herstelling</p> <p>0,5 technisch lekdicht</p> <p>0,5 met controle op het stop-druksysteem</p>	<p>door middel van geregelde visuele controles of apparatuur voor procescontrole-technologie</p>	
2	dynamische afdichtingen		hermetisch afgedicht				
2.1	afdichtingen met ronddraaiende onderdelen		afdichtingen die niet contactloos zijn				
2.2	afdichtingen voor trillende onderdelen		contactloze afdichtingen	<ul style="list-style-type: none"> <li>— pakkingbus-afdichting met zelf-aanpassing (met veerspanning)</li> <li>— labyrintafdichting</li> <li>— afdichting met gassmering</li> <li>— balgkleppen</li> <li>— zuigerpompen met balgafdichting</li> <li>— membraanpompen</li> <li>— konische membraankleppen</li> <li>— zuigerpompen</li> <li>— schraapveren</li> </ul>	<p>2</p> <p>2</p> <p>2</p> <p>1</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>0,5</p> <p>1</p> <p>1</p>	<p>0,5 met controle van het stopdruksysteem door geregelde controle, in de regel één maal per dag, of bijv. apparatuur voor procescontrole-technologie met alarm</p> <p>1 bij geregelde controle en herstelling</p> <p>0,5 technisch lekdicht</p> <p>0,5 met controle van de gasstroom</p>	
3.	overlaadpunten en vulpunten voor stoffen						
3.1	voor vaste stoffen						
3.1.1	zakken						

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index		Toelichting
				zonder	met aanvullende maatregelen	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.1.1	<b>zakken (leggen)</b>	open mangat, open container	— manueel leggen	4	2 met andere afzuigventilatieapparaatuur	Als er een gevaarlijke stof in de container aanwezig is, moet hiermee afdoende rekening worden gehouden
3.1.1.2	<b>zakken (vullen)</b>	machine voor het opensnijden en leggen van zakken machine voor het opensnijden en leggen van zakken met behuizing en met geïntegreerde afzuigventilatieapparaatuur manueel vullen, vullen van open zakken	— manueel vullen	1 4	1 met effectieve afzuigventilatieapparaatuur 1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig 0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaatuur 0,5 emissievrije gebruiksvorm (bijv slijtvaste masterbatch) 0,5 emissievrije gebruiksvorm (bijv slijtvaste masterbatch) <b>0,5 compressie en verpakking van de lege zakken binnen de behuizing, waarborging van lektheid door controle en herstelling</b> 2 met andere afzuigventilatieapparaatuur 1 met effectieve afzuigventilatieapparaatuur 1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig 0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaatuur 0,5 emissievrije gebruiksvorm (bijv slijtvaste masterbatch) 2 met andere afzuigventilatieapparaatuur 1 met effectieve afzuigventilatieapparaatuur 0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaatuur 1 met effectieve afzuigventilatieapparaatuur 0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaatuur <b>0,5 waarborging van lektheid door controle en herstelling*</b> <b>0,5 waarborging van lektheid door controle en herstelling*</b>	
3.1.2	<b>grote zakken, middelgrote bulkcontainers</b>		— ventielzak-vulmachine, bijv pneumatische verpakker, spiraalverpakker, netto-controleweger — vacuümverpakker	4		
3.1.2.1	<b>grote zakken, middelgrote bulkcontainers (leggen)</b>	open mangat	— vulmachine met volledige behuizing en met geïntegreerde afzuigventilatieapparaatuur — machine voor het vormen, vullen en sluiten van zakken — manueel leggen	1 1 4		

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index met aanvullende maatregelen		Toelichting
				zonder	6	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.2.2	grote zakken, middelgrote bulkcontainers (vullen)	<p>apparatuur voor het legen van grote zakken</p> <p>vullen van open grote zakken</p> <p>vulapparatuur voor grote zakken</p>	<p>— manueel vullen</p> <p>— open vullen</p>	<p>4</p> <p>1</p> <p>4</p>	<p>1 met effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>0,5 emissievrije gebruiksvorm (bij slijtvaste masterbatch)</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>0,5 emissievrije gebruiksvorm (bij slijtvaste masterbatch)</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>0,5 emissievrije gebruiksvorm (bij slijtvaste masterbatch)</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparatuur</p> <p>0,5 emissievrije gebruiksvorm (bij slijtvaste masterbatch)</p>	<p>7</p>
		<p>vulapparatuur voor grote zakken</p>	<p>— vulmachine met volledige behuizing en met geïntegreerde afzuigventilatieapparatuur</p> <p>— grote weegschaal voor zakken</p>	<p>1</p> <p>4</p>	<p>0,5 met speciale vulkoppen (bij zijdelingse sluiting) en stofvrije sluittechnologie; ultiem morsen uit de vulkop wordt voorkomen; waarborging van lekdichtheid door controle en herstelling</p>	

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index		Toelichting
				zonder	met aanvullende maatregelen	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.3	<b>containers</b>				1 met effectieve afzuigventilatieapparaat	
3.1.3.1	<b>containers (leg)</b>	met gesloten leegapparaat		1	<p>1 gebruiksvorm met een lage emissie, geen andere gevaarlijke stof aanwezig</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 emissievrije gebruiksvorm (bij slijt vaste masterbatch)</p> <p><b>0,5 als lekbaarheid wordt gewaarborgd door speciale maatregelen (bijv gecontroleerde zelfsluitende koppeling) en doordat geïntegreerde afzuigventilatieapparaat aanwezig is; waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*</b></p> <p>0,5 als lekbaarheid wordt gewaarborgd door speciale maatregelen (bijv gecontroleerde zelfsluitende koppeling) en doordat zeer effectieve afzuigventilatieapparaat aanwezig is; waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling</p>	De afdichting van het deksel van de container moet aan de eisen van punt 1.2 voldoen
3.1.3.2	<b>containers (vullen)</b>	met speciale vulapparaat		1	<p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p><b>0,5 als lekbaarheid wordt gewaarborgd door speciale maatregelen (bijv gecontroleerde zelfsluitende koppeling); waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*</b></p>	
3.1.4	<b>vaten</b>	met leegapparaat	— gesloten	1	<p>2 met andere afzuigventilatieapparaat</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat; waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*</p> <p><b>0,5 als lekbaarheid wordt gewaarborgd door speciale maatregelen (bijv gecontroleerde zelfsluitende koppeling) en doordat geïntegreerde afzuigventilatieapparaat aanwezig is</b></p>	

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index		Toelichting
				zonder	met aanvullende maatregelen	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.4.1	<b>vaten</b> (leggen)		<ul style="list-style-type: none"> <li>— mechanisch transport, bijv met een schroeftransporteur</li> <li>— pneumatisch transport, bijv lucht-blazer</li> </ul>	4	<p>0,5 als lekbaarheid wordt gewaarborgd door speciale maatregelen (bijv gecontroleerde zelfsluitende koppeling) en doordat afzuigventilatieapparaat of zeer effectieve afzuigventilatieapparaat aanwezig is</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparaat</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparaat</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparaat</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparaat</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>2 met andere afzuigventilatieapparaat</p> <p>1 met effectieve afzuigventilatieapparaat</p> <p>0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaat</p>	
3.1.4.2	<b>vaten</b> (vullen)	<p>open container</p> <p>met speciale vulapparaat</p> <p>open vullen</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— pneumatisch transport, bijv lucht-blazer</li> </ul>	1  4	<p>1</p> <p>4</p> <p>4</p>	
3.1.5	<b>tankauto's</b>					



Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index		Toelichting
				zonder	met aanvullende maatregelen	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.5.1	<b>tankauto's (legers)</b>	vaste pijpleiding, gelede arm slangverbinding	— vast gebruik (slangen en koppelingen voor de verbinding worden door het bedrijf verstrekt) — ander gebruik (slangen en koppelingen voor de verbinding worden niet door het bedrijf verstrekt)	1 1 2	0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; resten worden bij het koppelen en ontkoppelen volledig opgevangen 0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; resten worden bij het koppelen en ontkoppelen volledig opgevangen 1 Resten worden volledig opgevangen	
3.1.5.2	<b>tankauto's (vullen)</b>	vaste pijpleiding, gelede arm slangverbinding	— vast gebruik (slangen en koppelingen voor de verbinding worden door het bedrijf verstrekt) — ander gebruik (slangen en koppelingen voor de verbinding worden niet door het bedrijf verstrekt)	1 1 2	0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; resten worden bij het koppelen en ontkoppelen volledig opgevangen 0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; resten worden bij het koppelen en ontkoppelen volledig opgevangen 1 Resten worden volledig opgevangen	
3.1.6	<b>inlaat- en uitlaatfittingen</b>	voor silo's, vulapparatuur, bulkcontainers	— vlinderkleppen — kranen en stopkranen — vlakke schuifkleppen — schuifklepplaat — knelafsluiter met zachte afdichting — iris-membraanklep — slangklep	1 1 1 1 1 1 1	0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; geregelde reiniging 0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; geregelde reiniging 0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; geregelde reiniging 0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; geregelde reiniging	
3.2	<b>overlaadpunten voor vloeistoffen</b>			1		
3.2.1	<b>kleine containers en vaten</b>			1		
3.2.1.1	<b>kleine containers en vaten (legers)</b>	vaste koppelingen (pijpleidingen, slangaan sluitingen, gelede arm) open verpakkingsvaten	— met gasverdringing of gasafvoer op een veilig punt of overbrenging naar een zuiverings- of verbrandingsinstallatie — zonder gasverdringing en zonder gasafvoer op een veilig punt — met pomp of slang voor vaten	1 4 4	0,5 Waarborging van lekbaarheid door controle en herstelling*; test op lekkage na aanbrenge n, koppeling; resten worden volledig opgevangen 1 bij een constructie zonder lekkage en druppelen die is voorzien van zeer effectieve afzuigventilatieapparatuur	zie voor de onderdelen van de koppeling nr. 1 geregelde controle van de afzuigventilatieapparatuur; de kleine containers of vaten moeten direct na het vulproces worden gesloten

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index		Toelichting
				zonder	met aanvullende maatregelen	
1	2	3	4	5	6	7
3.2.1.2	kleine containers en vaten (vullen)	leggen in gesloten eenheden vaste koppelingen (pijpleidingen, slangaansluitingen, gelede arm)	— behuizing — met gasverdringing of gasafvoer op een veilig punt of overbrenging naar een zuiverings- of verbrandingsinstallatie — zonder gasverdringing en zonder gasafvoer — met vulslang — behuizing	1 1 4 4 1	0,5 met geïntegreerde afzuigventilatieapparaat en openen en sluiten van de verpakkingsvaten in de gesloten eenheid 0,5 Waarborging van lekdictheid door controle en herstelling*; test op lekkage na aanbrengen koppeling; resten worden volledig opgevangen 1 bij een constructie zonder lekkage en druppelen die is voorzien van effectieve afzuigventilatieapparaat 0,5 bij een constructie zonder lekkage en druppelen die is voorzien van zeer effectieve afzuigventilatieapparaat 0,5 met geïntegreerde afzuigventilatieapparaat en sluiten van de verpakkingsvaten in de gesloten eenheid	geregelde controle van de afzuigventilatieapparaat zie voor de onderdelen van de koppeling nr. 1 geregelde controle van de afzuigventilatieapparaat; de kleine containers of vaten moeten direct na het vulproces worden gesloten geregelde controle van de afzuigventilatieapparaat
3.2.2	Tankwaggen (spoor en weg), grote containers			1	0,5 Waarborging van lekdictheid door controle en herstelling * test op lekkage na aanbrengen koppeling; resten worden volledig opgevangen	zie voor de onderdelen van de koppeling nr. 1
3.2.2.1	Tankwaggen (spoor en weg), grote containers	vaste koppelingen, bijv. pijpleidingen, slangaansluitingen, stalen laadarmen andere slangaansluitingen	— met gasverdringing of gasafvoer op een veilig punt of overbrenging naar een zuiverings- of verbrandingsinstallatie — zonder gasverdringing en zonder gasafvoer	4 2	1 Resten worden volledig opgevangen	De containers moeten direct na het vullen worden gesloten
3.2.2.2	Tankwaggen (spoor en weg), grote containers (vullen)	vaste pijpleidingen, slangaansluitingen, stalen laadarmen open vullen	— met gasverdringing of gasafvoer op een veilig punt of overbrenging naar een zuiverings- of verbrandingsinstallatie — zonder gasverdringing en zonder gasafvoer — vulpijp	1 4 4	0,5 Waarborging van lekdictheid door controle en herstelling; test op lekkage na aanbrengen koppeling; resten worden volledig opgevangen 1 Met zeer effectieve afzuigventilatie; de resten worden volledig opgevangen	De containers moeten direct na het vullen worden gesloten
3.3	Overlaadpunten voor gassen			1	0,5 Waarborging van lekdictheid door controle en herstelling * test op lekkage na aanbrengen koppeling; gasverdringing of afvoer van resgassen op een veilig punt of overbrenging naar een zuiverings- of verbrandingsinstallatie	Zie voor de functionele onderdelen nr. 1 Gesloten systemen, delen van eenheden en functionele onderdelen moeten zodanig worden geëxploiteerd, gecontroleerd en onderhouden dat ze technisch lekdicht blijven bij de mechanische, chemische en thermische belasting die bij het voorgenomen gebruik kan worden verwacht.
3.3.1	Gassen (vullen en leggen)					
4	Bemonsteringspunten					

Nr.	Functioneel onderdeel	Type constructie	Voorbeelden van dit type constructie	Evaluatie-index		Toelichting
				zonder	met aanvullende maatregelen	
1	2	3	4	5	6	7
4.1	Open bemonstering		klep, stopkraan	4	2 met andere afzuigventilatieapparaatuur 1 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaatuur	Bemonstering moet gebeuren met behulp van een gesloten bemonsteringssysteem waarbij ongecontroleerd ontsnappen van het product wordt voorkomen. Onder ongecontroleerd ontsnappen wordt verstaan : — het spatten van vloeistof bij bemonstering uit delen van de installatie die onder druk staan — het nasijpelen van vloeistof uit stukken van de koppelingsbuis die op de bemonsteringseenheid wordt aangesloten — het ontsnappen van dampen van het product — het overstromen uit overvolle bemonsteringshouders
4.2	Gesloten bemonstering			1	<b>0.5 Waarborging van lektheid door controle en herstelling*</b>	
5	Opslag in verpakkingsvaten					
5.1	Vaste stoffen met uitzondering van bepaalde explosieven	Transportverpakking overeenkomstig de ADR-voorschriften	— vaten, containers	0,5		met afdoende ventilatie (min. tweevoudige luchtverversing)
5.2	Vaste stoffen, bepaalde explosieven (die nitroglycerine bevatten)	Transportverpakking overeenkomstig de ADR-voorschriften	— Balen; kunststof, textiel, papier en gelaagde zakken	0,5		met afdoende ventilatie (min. tweevoudige luchtverversing)
5.3	vloeistoffen	Transportverpakking overeenkomstig de ADR-voorschriften	— containers, metalen vaten, plaatijzer blikken, kunststof vaten, buizen, blikken, containers	0,5	2 met andere afzuigventilatieapparaatuur 1 met effectieve afzuigventilatieapparaatuur 0,5 met zeer effectieve afzuigventilatieapparaatuur	met afdoende ventilatie (min. tweevoudige luchtverversing)
5.4	Gassen	Transportverpakking overeenkomstig de ADR-voorschriften	cilinders met samengeperste gassen, containers met samengeperste gassen,	1	<b>0.5 Waarborging van lektheid door controle en herstelling</b>	met afdoende ventilatie (min. tweevoudige luchtverversing)  Zie voor de functionele onderdelen nr. 1; gesloten systemen, delen van eenheden en functionele onderdelen moeten zodanig worden geëxploiteerd, gecontroleerd en onderhouden dat ze technisch lekdicht blijven bij de mechanische, chemische en thermische belasting die bij het voorgenomen gebruik kan worden verwacht.
			vaten met samengeperste gassen			

(\*) De lektheid van demonteerbare koppelingen tussen installatie-eenheden en delen van de apparatuur kan worden gewaarborgd door de volgende maatregelen permanent toe te passen :

**1. Controle- of inspectie maatregelen om de actuele toestand van de demonteerbare koppeling overeenkomstig EN 13306 (in voorbereiding) te bepalen en te evalueren.**

Dit moet op vooraf bepaalde tijdstippen gebeuren volgens een schema dat is afgestemd op de specifieke behoeften van het bedrijf, de aard en de constructie van de koppeling en de aard en de eigenschappen van de chemische stoffen die de koppeling passeren. Voorbeelden van dergelijke maatregelen zijn :

- tests op lekkage;
- visueel onderzoek van de installatie om de punten te signaleren waar duidelijk lekkage optreedt, zoals plaatsen waar vloeistof lekt, onderzoek om strepen, geuren, geluiden en ijsvorming vast te stellen enz.;
- inspectie van de installatie met een mobiel apparaat voor lekindicatie en lekdetectie (zoals een gasdetectiebuis, een vlamionisatiedetector of een draagbare gasdetector);
- het aanbrengen van schuimvormers op de demonteerbare koppeling;
- het gebruik van gasdetectoren om de omgevingslucht te controleren;
- het gebruik van een automatisch lektestapparaat bij de gelede slang of de laadslang.

**2. Herstelmaatregelen om de demonteerbare koppeling overeenkomstig EN 13306 (in voorbereiding) in de gewenste toestand te herstellen.**

De planning en uitvoering van de maatregelen die wellicht nodig kunnen zijn, moet van geval tot geval worden bepaald en is afhankelijk van :

- de specifieke gevaarlijke stof;
- de aard en de omvang van de schade;
- de beschermings- en voorzorgsmaatregelen die moeten worden genomen.

Voordat de installatie weer in gebruik wordt genomen, moeten de herstelde koppelingen grondig op lekkage worden getest.

---

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

---

Bijlage IVA

Wanneer de Minister overeenkomstig de bepalingen van bijlage VII A inzake tussenproducten toestemming heeft gegeven voor de toepassing van een beperkt testpakket voor een chemische stof, worden de voorschriften van dit onderdeel als volgt beperkt :

— Wanneer de hoeveelheid van de stof die in de handel wordt gebracht, 10 ton per jaar per fabrikant of meer bedraagt of wanneer de totale hoeveelheid van de stof die in de handel wordt gebracht, 50 ton per fabrikant of meer bedraagt, stelt de desbetreffende Minister alle tests en onderzoeken verplicht die in de punten 3 tot en met 6 van bijlage VII A worden genoemd (met uitzondering van degene die al zijn uitgevoerd). Daarnaast kan de desbetreffende Minister de tests en onderzoeken van niveau 1 in verband met aquatische organismen verplicht stellen.

— Wanneer de hoeveelheid van de stof die in de handel wordt gebracht, 100 ton per jaar per fabrikant of meer bedraagt of wanneer de totale hoeveelheid van de stof die in de handel wordt gebracht, 500 ton per fabrikant of meer bedraagt, stelt de desbetreffende Minister de tests en onderzoeken van niveau 1 in verband met toxiciteit voor de voortplantingsfunctie verplicht. De Minister kan besluiten dat de indeling van de stof als tussenproduct dat voor een beperkt testpakket in aanmerking komt, een goede reden is om te stellen dat een of meer van de tests of onderzoeken, behalve degene in verband met toxiciteit voor de voortplantingsfunctie, niet nodig zijn.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

---

Bijlage IVB

Wanneer de hoeveelheid van de stof die in de handel wordt gebracht, 1 000 ton per jaar per fabrikant of meer bedraagt of wanneer de totale hoeveelheid van de stof die in de handel wordt gebracht, 5 000 ton per fabrikant of meer bedraagt; zijn tests en onderzoeken van de niveaus 1 en 2, normalerwijs niet vereist. De Minister moet aanvullende tests en onderzoeken overwegen en kan aanvullende tests en onderzoeken vereisen inclusief de tests en onderzoeken van de niveaus 1 en 2 van deze Bijlage.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 juli 2002.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

## Annexe 1A

L'administration du témoin positif par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai est acceptable; Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

## ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

## Annexe IB

B.26. ESSAI DE TOXICITE SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE  
TOXICITE ORALE A DOSES REPETEES — RONGEURS : 90 JOURS

## 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 408 de l'OCDE (1998).

## 1.1 INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition répétée durant une période prolongée, période qui s'étend du sevrage jusqu'à l'état adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode accorde davantage d'importance aux effets neurologiques et donne des indications relatives aux effets sur le système immunitaire et sur la reproduction. Elle insiste également sur la nécessité d'observer très attentivement les animaux sur le plan clinique, en vue d'obtenir le plus d'informations possible. Cette étude devrait permettre de repérer les produits chimiques susceptibles d'avoir une action neurotoxique ou des effets sur le système immunitaire ou les organes reproducteurs, pouvant justifier des études plus approfondies.

Voir également introduction générale, partie B.

## 1.2 DEFINITIONS

**Dose** : quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

**Dosage** : terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

**DSET** : abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL : No Observable Adverse Effect Level) c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

## 1.3 PRINCIPE DE LA METHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'un niveau de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration, afin de déceler d'éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés; au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

## 1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE

## 1.4.1 Préparation des animaux

Il convient d'utiliser des animaux en bonne santé, ayant été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et qui n'ont pas encore été sujets d'expériences. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et les groupes témoins. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. Un numéro d'identification unique est attribué à chaque animal.

## 1.4.2 Préparation des doses

La substance d'essai est administrée par gavage ou dans les aliments ou dans l'eau de boisson. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

## 1.4.3 Conditions d'essai

## 1.4.3.1 Animaux d'expérience

L'espèce préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs, notamment la souris, puissent être utilisées. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes, sains, issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et en aucun cas au-delà de l'âge de neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder  $\pm 20\%$  de la moyenne du poids de chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.



#### 1.4.3.2 *Nombre et sexe*

Au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur un produit de structure très proche, on pourra envisager d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer, une fois la période de traitement terminée, la persistance ou la réversibilité de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement devrait être fixée en fonction des effets observés.

#### 1.4.3.3 *Niveaux de dose*

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.4.3.4). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées ou d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance ou à ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort, ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourrit en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations toxicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas : effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

#### 1.4.3.4 *Essai limite*

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

### 1.5 MODE OPERATOIRE

#### 1.5.1 *Administration des doses*

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

#### 1.5.2 *Observations*

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Deux fois par jour au minimum, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Ils doivent être soigneusement consignés, de préférence en utilisant un système de notation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes relevés devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréments, ainsi que l'activité autonome (sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres (par exemple, auto-mutilation, marche à reculons) (1).

A l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

Vers la fin de la période d'exposition, mais en aucun cas avant la onzième semaine, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (1) (auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (2) (3) (4), et évaluer la force de préhension (5) et l'activité motrice (6). Des détails supplémentaires sur les méthodes utilisables figurent dans les références respectives. Des méthodes non décrites dans les références peuvent aussi être appliquées.

Les observations fonctionnelles préconisées vers la fin de l'étude ne sont pas indispensables si on dispose d'observations fonctionnelles provenant d'autres études et que les examens cliniques quotidiens n'ont pas révélé de troubles fonctionnels.

Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

#### 1.5.2.1 Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

#### 1.5.2.2 Hématologie et biochimie clinique

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. A la fin de la période d'essai, des prélèvements sont réalisés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

On procédera aux examens hématologiques suivants au terme de la période d'essai et sur les prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant : hématicrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des leucocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps de coagulation.

Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur chaque animal juste avant son sacrifice ou au cours de celui-ci (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai). A l'instar des examens hématologiques, les analyses de biochimie clinique peuvent être conduites sur des échantillons de sang prélevés en cours d'essai. Il est recommandé de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang (1). Les analyses effectuées sur le plasma ou le sérum devraient comprendre le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, l'azote uréique du sang, la créatinine, les concentrations totales de protéines et d'albumine et plus de deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyl transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Des mesures d'activités enzymatiques supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, peuvent également être incluses.

Les analyses d'urine suivantes peuvent être réalisées, à titre facultatif, au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés : apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

Il faut envisager par ailleurs de rechercher les indicateurs sériques de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter des courbes métaboliques connexes, d'autres analyses devraient être pratiquées, notamment celles du calcium, du phosphore, des triglycérides à jeun, d'hormones spécifiques, de la méthémoglobine et de la cholinestérase. Ces analyses doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

Si les données historiques sont insuffisantes, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres d'hématologie et de biochimie clinique avant de commencer l'étude; il est généralement déconseillé d'obtenir ces données avant le traitement (7).

#### 1.5.2.3 Autopsie

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, l'utérus, les ovaires, le thymus, la rate, le cerveau et le coeur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu : tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux : cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'oesophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le coeur, la trachée et les poumons (traités par gonflement avec un fixateur, puis immergés), l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, la vésicule biliaire (souris), les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatique ou poplitée interne) de préférence proche du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou ponction de moelle osseuse examinée directement), la peau et les yeux (si des changements ont été relevés au cours des examens ophtalmologiques). Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

#### 1.5.2.4 Histopathologie

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 RESULTATS

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité et une description des symptômes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques doivent être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser doit intervenir au stade de rédaction du protocole d'étude.

### 2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.2.1 Substance d'essai :

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques;
- données permettant l'identification chimique;
- véhicule (le cas échéant) justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

#### 2.2.2 Animaux d'expérience :

- espèce et souche utilisée;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

#### 2.2.3 Conditions d'essai

- justification du choix des doses;
- détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai;
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu;
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

#### 2.2.4 Résultats :

- poids corporel et variation de poids corporel;
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant;
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité;
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non);
- résultats de l'examen ophtalmologique;
- évaluations de l'activité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice (le cas échéant);
- paramètres hématologiques et valeurs normales de référence;
- paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence;
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel;
- résultats d'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques;
- données relatives à l'absorption, le cas échéant;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

### 3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document n°. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health.* 9, pp 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Philips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery : Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, pp 108, 267-283.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *neurobehav. Toxicol.*, pp 1, 233-236.
- (6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments : Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, pp 13, 599-609.
- (7) Weingand K. Brown G, Hall R et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.*, pp 29, 198-201.

---

#### Notes

(1) Pour un certain nombre de paramètres mesurés dans le sérum ou le plasma, et particulièrement pour le glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang, et ce, essentiellement afin d'éviter l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement de la prise de nourriture et qui aurait tendance à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation difficile. Cependant, le jeûne des animaux durant une nuit entière peut influencer sur leur métabolisme général et risque, notamment dans les études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on a choisi de faire jeûner les animaux toute la nuit, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles de l'étude.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

---

#### Annexe I C

### B.27. ESSAI DE TOXICITE SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE

#### TOXICITE ORALE A DOSES REPETEES NON-RONGEURS : 90 JOURS

##### 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 409 de l'OCDE (1998).

##### 1.1 INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition répétée durant une période de croissance rapide jusqu'au début de l'âge adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la Dose Sans Effet Toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode d'essai permet de mettre en évidence les effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques chez des non-rongeurs; elle ne doit être utilisée que dans les cas suivants :

- lorsque les effets observés dans d'autres études font ressortir la nécessité d'éclaircir et de préciser certains points chez une deuxième espèce non-rongeurs, ou
- lorsque les études toxicocinétiques montrent que l'utilisation d'une espèce particulière de non-rongeur constitue le choix le plus pertinent en tant qu'animal d'expérience ou
- lorsque d'autres raisons précises justifient l'utilisation d'une espèce de non-rongeur.

Voir également introduction générale, Partie B.

##### 1.2 DEFINITIONS

**Dose :** quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

**Dosage :** terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

**DSET :** abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL : No Observable Adverse Effect Level) c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.



### 1.3 PRINCIPE DE LA METHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement, afin de déceler d'éventuels symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

### 1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE

#### 1.4.1 Sélection de l'espèce animale

L'espèce non-rongeur couramment utilisée est le chien, dont la race doit être définie; on se sert fréquemment du beagle. D'autres espèces, par exemple le porc ou le porc nain (mini porc), peuvent aussi être utilisées. Les primates ne sont pas recommandés et leur utilisation doit être justifiée. Il convient d'employer de jeunes animaux en bonne santé et, dans le cas du chien, l'administration de la substance à tester devrait commencer de préférence à l'âge de 4-6 mois, et jamais au delà de 9 mois. Lorsque l'étude est préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser la même espèce et la même race dans les deux études.

#### 1.4.2 Préparation des animaux

Il convient d'utiliser de jeunes animaux, en bonne santé, acclimatés aux conditions du laboratoire et n'ayant pas encore été sujets d'expérience. La durée de l'acclimatation dépendra de l'espèce d'essai sélectionnée et de sa provenance. Il est recommandé de compter au moins 5 jours pour les chiens ou les porcs élevés à cette fin dans une animalerie résidente et au moins deux semaines pour ces mêmes animaux s'ils proviennent de sources extérieures. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. Un numéro d'identification distinct doit être attribué à chaque animal.

#### 1.4.3 Préparation des doses

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou dans l'eau de boisson, par gavage ou dans des capsules. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

### 1.5 MODE OPERATOIRE

#### 1.5.1 Nombre et sexe des animaux

Il faut employer au moins huit animaux (quatre femelles et quatre mâles) à chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. Le nombre d'animaux survivants au terme de l'étude doit être suffisant pour permettre une évaluation significative des effets toxiques. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur une substance de structure très proche, on envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de huit animaux (quatre par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la concentration la plus élevée, en vue d'observer, une fois la période de traitement écoulée, la réversibilité ou la persistance de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement doit être fixée en fonction des effets observés.

#### 1.5.2 Dosage

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.5.3). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai ou par ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort, ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations lexicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

#### 1.5.3 Essai limite

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.



#### 1.5.4 Administration des doses

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume devrait normalement être le plus petit possible. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage ou dans une capsule, la dose doit être administrée aux mêmes heures chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

#### 1.5.5 Observations

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Au moins deux fois par jour, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués, si possible, hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes de toxicité doivent être soigneusement notés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité. Les observations devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréments, ainsi que l'activité autonome (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres.

A l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décele des changements liés au traitement dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

##### 1.5.5.1 Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

##### 1.5.5.2 Hématologie et biochimie clinique

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. A la fin de la période d'essai, des échantillons sont prélevés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

Au début de l'essai et, par la suite, soit tous les mois, soit à partir du milieu de la période d'essai et à la fin de celle-ci, il y a lieu d'effectuer un examen hématologique en mesurant l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, la numération des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire, la numération des plaquettes et l'étude de paramètres de la coagulation tels que le temps de coagulation, le temps de prothrombine ou le temps de thromboplastine.

Des analyses de biochimie clinique destinées à l'étude des principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux, au début de l'essai et ensuite soit tous les mois, soit au milieu et à la fin de l'essai. Les paramètres qui doivent être analysés comprennent l'équilibre électrolytique, le métabolisme des glucides et les fonctions hépatiques et rénales. Le choix de certaines analyses dépendra des observations sur le mode d'action de la substance d'essai. Les animaux doivent être mis à jeun durant une période dépendant de l'espèce avant la prise de sang. Les analyses proposées comprennent le calcium, le phosphore, le chlore, le sodium, le potassium, le glucose à jeun, l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, l'ornithine décarboxylase, la gamma glutamyle transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine sanguine et les concentrations totales de bilirubine et de protéines sériques.

Les analyses d'urine doivent être pratiquées au moins au début, au milieu et en fin d'essai, sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés. Les paramètres à relever sont l'apparence, le volume, l'osmolalité ou la densité, le pH, les protéines, le glucose, le sang et les cellules sanguines. Des paramètres supplémentaires peuvent être étudiés, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés.

Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher des indicateurs de lésions générales des tissus. D'autres déterminations pourraient être nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate : l'analyse des lipides, des hormones, de l'équilibre acido-basique, de la méthémoglobine et de l'inhibition de la cholinestérase. Des analyses de biochimie clinique supplémentaires peuvent être pratiquées, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés. Celles-ci doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

### 1.5.5.3 Autopsie

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie et la vésicule biliaire, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, les ovaires, l'utérus, la thyroïde (et les glandes parathyroïdes) le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu : tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux : cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, les yeux, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons, l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage, afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatiques ou tibiaux), de préférence proches du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou une ponction de moelle osseuse examinée directement) et la peau. Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des organes cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

### 1.5.5.4 Histopathologie

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au moins au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 RESULTATS

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité et une description des signes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser devrait intervenir au stade de la rédaction du protocole d'étude.

### 2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.2.1 Substance d'essai

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques;
- données permettant l'identification chimique;
- véhicule (le cas échéant); justification du choix si autre que l'eau.

#### 2.2.2 Animaux d'expérience

- espèce et souche utilisée;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

#### 2.2.3 Conditions d'essai

- justification du choix des doses;
- détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai;
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu;
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

#### 2.2.4 Résultats

- poids corporel et variation de poids corporel;
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant;
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité;
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non);
- résultats de l'examen ophtalmologique;
- paramètres hématologiques et valeurs normales de référence;
- paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence;
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel;
- résultats d'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques;
- données relatives à l'absorption, le cas échéant;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

#### Annexe I D

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

##### 1. METHODE

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

##### 1.1 INTRODUCTION

Cet essai vise à évaluer les effets d'une exposition prolongée à des produits chimiques sur la croissance des poissons au stade juvénile. Il s'appuie sur une méthode mise au point et soumise à des essais tournants (1) (3) dans l'Union européenne, qui a pour objet d'évaluer les effets de substances chimiques sur la croissance de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au stade juvénile dans des conditions dynamiques. D'autres espèces de poissons bien étudiées peuvent être utilisées. Par exemple, on possède une certaine expérience des essais de croissance sur le danio (*Danio rerio*) (2) (4) (5) et sur le medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

Voir aussi introduction générale, Partie C.

##### 1.2 DEFINITIONS

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

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

$CE_x$  : dans la méthode décrite pour cet essai, la concentration de la substance d'essai qui provoque une variation de  $x$  % du taux de croissance des poissons par rapport aux témoins.

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

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

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

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

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

##### 1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

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

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

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

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

#### 1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

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

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

#### 1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

##### 1.6.1 Appareillage

On utilise du matériel courant de laboratoire et notamment :

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

##### 1.6.2 Eau

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

##### 1.6.3 Solutions d'essai

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

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

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

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, au cours de l'essai, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de celui-ci. Un essai tournant (3) a montré que, pour la truite arc-en-ciel, une fréquence de renouvellement de l'eau au cours de l'essai de 6 litres/g de poisson/jour était acceptable (voir point 1.8.2.2).

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



#### 1.6.4 Sélection de l'espèce

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est recommandée dans cet essai car c'est à propos de cette espèce que l'on a acquis la plus grande expérience au cours d'essais tournants (1) (3). D'autres espèces bien étudiées peuvent cependant être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Par exemple, on dispose également d'une certaine expérience au sujet du danio (*Danio rerio*) (4) (5) et du medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Dans ce cas, le choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doit être justifié.

#### 1.6.5 Soins des poissons

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

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

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

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

#### 1.7 CONCEPTION DE L'ESSAI

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

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

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

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

Dans la plupart des cas, l'analyse par régression est préférable à l'analyse de la variance, pour des raisons exposées par Stephan et Rogers (9). Cependant, si on ne trouve aucun modèle de régression adéquat ( $r^2 < 0.9$ ), il faut recourir à la CSEO/CMEO.

##### 1.7.1 Conception pour l'analyse par régression

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

a) La concentration avec effet (par exemple,  $CE_{10,20,30}$ ) et la gamme de concentrations dans laquelle la substance d'essai produit un effet intéressant doivent nécessairement être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. La précision avec laquelle les concentrations produisant un effet peuvent être estimées sera la meilleure lorsque la concentration avec effet se trouve au milieu de la plage des concentrations testées. Un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut s'avérer utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.

b) Pour satisfaire les conditions de la modélisation statistique, l'essai doit comporter au moins un récipient témoin et cinq autres à différentes concentrations. Le cas échéant, lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il faudrait étudier un groupe témoin contenant l'agent solubilisant à la concentration d'essai la plus élevée en plus des groupes d'essai (voir paragraphes 1.8.3 and 1.8.4).

c) Une série géométrique ou logarithmique appropriée (10) (voir appendice 3) peut être utilisée. Un espacement logarithmique entre les concentrations d'essai est préférable.

d) Si on dispose de plus de six récipients, les récipients supplémentaires devraient servir de répliques ou être répartis dans la gamme des concentrations de manière à diminuer l'espacement entre les concentrations. Ces deux mesures sont aussi valables l'une que l'autre.

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

Il serait préférable d'avoir plusieurs récipients répliques pour chaque concentration, et d'effectuer l'analyse statistique au niveau du récipient (11). Sans récipients répliques, il est impossible de prendre en compte la variabilité entre les récipients en plus de celle qui existe d'un poisson à l'autre. L'expérience a cependant montré (12) que la variabilité entre les récipients était très inférieure à celle qui existe au sein de chaque récipient (autrement dit, entre les poissons) dans le cas examiné. C'est pourquoi une alternative relativement acceptable consiste à effectuer l'analyse statistique au niveau de chaque poisson.

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

Généralement, lorsque les essais sont conduits dans des récipients répliques, le nombre de récipients témoins répliques, et par conséquent le nombre de poissons, devrait être le double du nombre choisi à chaque concentration d'essai, qui devrait être toujours le même (13) (14) (15). A contrario, sans récipients répliques, le nombre de poissons dans le groupe témoin devrait être le même que dans chaque concentration d'essai.

Si l'analyse de la variance est conduite au niveau des récipients plutôt qu'à celui des poissons (ce qui exigerait un marquage individuel des poissons ou l'utilisation de taux de croissance « pseudo-spécifiques » [voir paragraphe 2.1.2]), il faut un nombre suffisant de récipients répliques pour pouvoir déterminer l'écart-type entre les « récipients de même concentration ». Ce qui signifie que l'erreur dans l'analyse de la variance ait au moins 5 degrés de liberté (11). Si seuls les témoins ont des répliques, la variabilité de l'erreur risque d'être faussée puisqu'elle pourrait s'accroître avec la valeur moyenne du taux de croissance en question. Comme le taux de croissance a des chances de diminuer lorsque la concentration augmente, on aura tendance à surestimer la variabilité.



## 1.8 MODE OPERATOIRE

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

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

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

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

### 1.8.2 Conditions d'exposition

#### 1.8.2.1 Durée

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

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

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

#### 1.8.2.3 Alimentation

Les poissons doivent recevoir une alimentation adéquate (appendice 1) en quantité suffisante pour permettre un taux de croissance acceptable. Il faut veiller à éviter la prolifération microbienne et la turbidité de l'eau. Dans le cas de la truite arc-en-ciel, une ration quotidienne de 4 % de son poids corporel par jour devrait remplir ces conditions (3) (16) (17) (18). La ration quotidienne peut être divisée en deux parts égales et administrée aux poissons en deux fois, à au moins 5 heures d'intervalle. La ration est fonction du poids total initial des poissons dans chaque récipient d'essai. Si les poissons sont pesés à nouveau le 14<sup>e</sup>me jour, on recalcule la ration. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent leur pesée.

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

#### 1.8.2.4 Lumière et température

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

### 1.8.3 Concentrations d'essai

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

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

#### 1.8.4 Témoins

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 1.8.6 Observations

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

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

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

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

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

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

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

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

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

où:

$r_1$  = taux de croissance spécifique de chaque poisson

$r_2$  = taux de croissance spécifique moyen par récipient

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La méthode d'ajustement du modèle doit permettre d'estimer, par exemple, la  $CE_{20}$  et de déduire sa dispersion (écart-type ou intervalle de confiance). Le graphique du modèle ajusté devrait être montré en regard des données pour permettre d'apprécier l'adéquation de l'ajustement du modèle (9) (19) (20) (21).

### 2.1.2 Analyse des résultats pour l'estimation de la CME0

Si le test porte sur plusieurs récipients d'essai répliques (identiques) pour toutes les concentrations, l'estimation de la CME0 pourrait s'appuyer sur une analyse de la variance du taux de croissance spécifique moyen de chaque récipient (voir point 2.1), suivie de l'utilisation d'une méthode pertinente (par exemple, un test de Dunnett ou de Williams (13) (14) (15) (22) consistant à comparer la moyenne  $r$  à chaque concentration avec la moyenne  $r$  des témoins, afin d'identifier la concentration minimale à laquelle cette différence est significative avec un seuil de probabilité de 0,05. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne sont pas remplies — distribution non normale (par exemple, test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de mener l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse pondérée de la variance.

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

La moyenne  $r_3$  pour chaque concentration d'essai peut ensuite être comparée à la moyenne  $r_3$  des témoins. Et la CME0 peut alors être déterminée comme précédemment. Il faut admettre que cette méthode ne tient absolument pas compte de la variabilité entre les récipients, en dehors de celle imputable à la variabilité entre les poissons, et n'offre aucune protection à cet égard. L'expérience a cependant montré (9) que la variabilité entre les récipients était très faible par rapport à celle qui existe dans les récipients (c'est-à-dire entre les poissons). Si l'analyse n'englobe pas les données concernant chaque poisson, il convient d'indiquer la méthode d'identification des valeurs aberrantes (erronées) et de justifier son emploi.

## 2.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

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

## 2.3 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes :

### 2.3.1 Substance d'essai

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

### 2.3.2 Espèce testée

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

### 2.3.3 Conditions d'essai

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

### 2.3.4 Résultats

- données montrant que les témoins remplissent les critères de validité relatifs à la survie, et données sur la mortalité à toutes les concentrations d'essai;
- techniques d'analyse statistique appliquées, statistiques fondées sur les répliques ou les poissons, traitement des données et justification des méthodes utilisées;
- tableaux donnant les poids individuels et moyens des poissons aux jours 0, 14 (si mesurés) et 28, valeurs des moyennes par récipient ou taux de croissance pseudo- spécifiques (s'il y a lieu) pour les périodes de 0 à 28 jours, ou éventuellement de 0 à 14 et de 14 à 28 jours;
- résultats de l'analyse statistique (analyse par régression ou analyse de la variance) fournis de préférence sous forme de tableau ou de graphique, CME0 ( $p = 0,05$ ) et CSE0 ou  $CE_x$  avec leurs écarts-types si possible;
- incidence de toute réaction inhabituelle des poissons et de tout effet visible produit par la substance d'essai.

### 3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology : an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236
- (3) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (4) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.
- (5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) : results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 157-164.
- (6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (7) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp 287-297.
- (8) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (9) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.
- (10) Environment Canada (1992). Biological test method : toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.
- (11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt
- (12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- (13) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.
- (15) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.
- (16) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* : effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.
- (17) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.
- (18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.
- (19) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.
- (20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- (21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity : the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.



## APPENDICE 1

## ESPECES DE POISSONS RECOMMANDEES POUR L'ESSAI ET CONDITIONS D'ESSAI APPROPRIEES

Espèce	Gamme de températures recommandée (°C)	Photopériode (heures)	Gamme recommandée pour le poids initial des poissons (g)	Précision requise de la mesure	Taux de charge (g/l)	Densité de peuplement (par litre)	Alimentation	Durée de l'essai (jours)
<b>Espèce recommandée :</b>								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel	12,5 - 16,0	12 - 16	1 - 5	à 100 mg près	1,2 - 2,0	4	spécialité alimentaire sèche pour frai de salmonidé	≥ 28
<b>Autres espèces bien étudiées :</b>								
<i>Danio rerio</i> Danio	21 - 25	12 - 16	0,050 - 0,100	à 1 mg près	0,2 - 1,0	5 - 10	nourriture vivante (Brachionus Artemia)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> medaka	21 - 25	12 - 16	0,050 - 0,100	à 1 mg près	0,2 - 1,0	5 - 20	nourriture vivante (Brachionus Artemia)	≥ 28

## APPENDICE 2

## QUELQUES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

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

## APPENDICE 3

## SERIE LOGARITHMIQUE DE CONCENTRATIONS CONVENANT A UN ESSAI DE TOXICITE (9)

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

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

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

### 1. METHODE

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

#### 1.1 INTRODUCTION

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

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

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

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

#### 1.2 DEFINITIONS

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

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

#### 1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

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

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

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

Les informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le  $pK_a$ , le coefficient de partage n-octanol/eau ( $P_{oe}$ ) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir Méthode C.4).

#### 1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

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

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

## 1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

### 1.6.1 Enceintes d'essai

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

### 1.6.2 Sélection des espèces de poissons

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

### 1.6.3 Soins des poissons géniteurs

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

### 1.6.4 Manipulation des embryons et des larves

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

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

#### Notes

<sup>(1)</sup> OCDE, Paris, ligne directrice 210, « Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie ».

### 1.6.5 Eau

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

### 1.6.6 Solutions d'essai

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

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

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

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

#### 1.7 MODE OPERATOIRE

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

#### 1.7.1 Conditions d'exposition

##### 1.7.1.1 Durée

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

##### 1.7.1.2 Charge

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

##### 1.7.1.3 Lumière et température

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

#### 1.7.2 Concentrations d'essai

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

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

#### 1.7.3 Témoins

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

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

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

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

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

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

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

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



## 1.7.5 Observations

### 1.7.5.1 Stade de développement embryonnaire

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

### 1.7.5.2 Ecllosion et survie

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

— **pour les œufs** : en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque.

— **pour les embryons** : absence de mouvement corporel et/ ou absence de battement du cœur et/ou décoloration opaque chez les espèces dont les embryons sont normalement transparents;

— **pour les larves** : immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction aux stimuli mécaniques.

### 1.7.5.3 Aspect anormal

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

### 1.7.5.4 Comportement anormal

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

### 1.7.5.5 Longueur

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

### 1.7.5.6 Poids

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

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

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

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

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

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

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

## 2.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

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

### 2.3 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.3.1 Substance d'essai

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

#### 2.3.2 Espèce d'expérience

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

#### 2.3.3 Conditions d'essai

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

#### 2.3.4 Résultats

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

## 3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final Report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life- Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish : Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/ 3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish : Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/ 3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish ( *Brachydanio rerio* ) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.
- (6) Legault R. (1958). Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting of Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- Buchanan). Copeia, 4, pp. 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. et Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo- larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short- term Fish and Amphibian Embryo- larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry, 4, pp. 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.
- (10) Kirchen R. V. et W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4) : 1-4. Carolina Biological Supply Company.

- (11) Kirchen R. V. et W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure- Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/ RM/ 28, décembre 1992, 81 pp.
- (17) Dave G. et Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H. et Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252, pp. 231- 236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. et Roubaud P. (1995). Toxic effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety, 32, pp. 19-28 (1995).
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, décembre 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/ 600/ 3-91/ 063, décembre 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven- day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test : an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10 pp. 1189- 1203.
- (23) Calow P. (1993). Vol. 1, chapter 10 : Methods for spawning, culturing and conducting toxicity Tests with Early Life stages of Estuarine and Marine Fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes : New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Junk Publ., Dordrecht. 280 pp.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development. In : W. S. Hoar and D. J. Randall, Eds., Fish Physiology, vol XIA, Academic Press, pp. 1- 58.

TABLEAU 1A : ESPECES DE POISSONS RECOMMANDEES POUR L'ESSAI

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

TABLEAU 1B : EXEMPLES D'AUTRES ESPECES EGALEMENT UTILISEES ET SUR LESQUELLES ON POSSEDE UNE BONNE DOCUMENTATION

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

## ANNEXE 1

**ORIENTATIONS POUR LA REALISATION D'UN ESSAI DE TOXICITE  
SUR LES EMBRYONS ET LES ALEVINS DU DANIO (BRACHYDANIO RERIO)**

## INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### CALCULS ET STATISTIQUES

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

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

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

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

où :

P = pourcentage de survivants corrigé

P' = pourcentage de survivants observé dans la concentration d'essai

C = pourcentage de survivants chez les témoins

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

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

#### ESTIMATION DE LA CMEO ET DE LA CSEO

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

#### BIBLIOGRAPHIE

(1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. *J. Fish Biol.* 10 pp. 121-173.

(2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) *J. Morph.*, 102, pp 311.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). *Journal of Applied Ichthyology*, 2, pp 173-181.

(4) Finney D.J. (1971). *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.

(5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment* : Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp 1096-1121.

(7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*, 20 pp. 482-491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 27, pp 103-117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics* 28, pp 519-531.

(10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W.H. Freeman and Co., San Francisco.



## APPENDICE 2

## CONDITIONS ET DUREE DE L'ESSAI, ET CRITERES DE SURVIE POUR LES ESPECES RECOMMANDEES

Espèce	Température (degrés C)	Salinité (‰)	Photo-période (heures)	Durée des stades (jours)		Durée habituelle de l'essai	Survie des témoins (% minimum)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio	25 ± 1	—	12 - 16	3 - 5	8 - 10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (8-10 jours)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30 - 35	25 - 30	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 20 jours après l'éclosion (50-55 jours)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune	21 - 25	—	12 - 16	5	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12 - 16	8 - 11	4 - 8	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (13-16 jours)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule	25 ± 2	—	16	4 - 5	5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	60	70

(1) Pour les embryons

(2) Pour les larves

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

## APPENDICE 3

## CONDITIONS DE L'ESSAI, DUREE ET CRITERES DE SURVIE POUR D'AUTRES ESPECES SUR LESQUELLES ON POSSEDE UNE BONNE DOCUMENTATION

Espèce	Température (degrés C)	Salinité (‰)	Photo-période (heures)	Durée des stades (jours)		Durée habituelle de l'essai sur l'embryon et l'alevin	Survie des témoins (% minimum)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE								
<i>Carassius auratus</i> Cyprin doré	24 ± 1	—	—	3 - 4	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Crapet arlequin	21 ± 1	—	16	3	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	—	75
EAU SALEE								
<i>Menidia peninsulae</i> Capucette nord-américaine	22 - 25	15 - 22	12	1.5	10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (6-7 jours)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Hareng	10 ± 1	8 - 15	12	20 - 25	3 - 5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (23-27 jours)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Morue	5 ± 1	5 - 30	12	14 - 16	3 - 5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (18 jours)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton	25 ± 1	15 - 30	12	—	—	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4/7 jours après l'éclosion (28 jours)	> 75	80

## APPENDICE 4

## QUELQUES CARACTERISTIQUES 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
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

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

## 1. METHODE

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

## 1.1 INTRODUCTION

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

## 1.2 DEFINITIONS

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

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

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

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

## 1.3 PRINCIPE DE LA METHODE

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

## 1.4 VALIDITE DE L'ESSAI

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

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

## 1.5 DESCRIPTION DE LA METHODE

## 1.5.1 Collecte des abeilles

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

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

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

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

### 1.5.3 Préparation des abeilles

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

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

### 1.5.4 Préparation des doses

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

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

## 1.6 MODE OPERATOIRE

### 1.6.1 Groupes testés et groupes témoins

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

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

### 1.6.2 Etalon de toxicité

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

### 1.6.3 Exposition

#### 1.6.3.1 Administration des doses

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

#### 1.6.3.2 Durée

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

### 1.6.4 Observations

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

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

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

### 1.6.5 Essai limite

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

## 2 RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 RESULTATS

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

### 2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.2.1 Substance d'essai :

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

#### 2.2.2 Espèce d'expérience :

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

#### 2.2.3 Conditions d'essai :

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

#### 2.2.4 Résultats :

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

## 3. BIBLIOGRAPHIE

(1) EPPO/Council of Europe. Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1 pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J, McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22 pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. et Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96 pp. 99-113.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New- York.

(5) ABBOTT, W.S. (1925). A METHOD FOR COMPUTING THE EFFECTIVENESS OF AN INSECTICIDE. JOUR. ECON. ENTOMOL., 18 pp. 265-267.



**C.17. ABEILLE DOMESTIQUE, ESSAI DE TOXICITE AIGUË PAR CONTACT****1. METHODE**

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

**1.1 INTRODUCTION**

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

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

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

**1.2 DEFINITIONS**

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

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

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

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

**1.3 PRINCIPE DE LA METHODE**

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

**1.4 VALIDITE DE L'ESSAI**

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

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

**1.5 DESCRIPTION DE LA METHODE****1.5.1 Collecte des abeilles**

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

**1.5.2 Conditions d'encagement et d'alimentation**

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

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

**1.5.3 Préparation des abeilles**

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

**1.5.4 Préparation des doses**

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

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

## 1.6 MODE OPERATOIRE

### 1.6.1 Groupes testés et groupes témoins

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

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

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

### 1.6.2 Etalon de toxicité

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

### 1.6.3 Exposition

#### 1.6.3.1 Administration des doses

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

#### 1.6.3.2 Durée

L'essai dure 48 heures. Si la mortalité augmente de plus de 10 % entre 24 heures et 48 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

### 1.6.4 Observations

La mortalité est relevée 4 heures après l'application de la dose, puis 24 heures et 48 heures après celle-ci. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures pendant 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

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

### 1.6.5 Essai limite

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

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 RESULTATS

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

### 2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### 2.2.1 Substance d'essai :

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur);

— données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

#### 2.2.2 Espèce d'expérience :

— nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte;

— informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

#### 2.2.3 Conditions d'essai :

— température et humidité relative de la salle d'expérience;

— conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages;

— modalités d'administration de la substance d'essai, par exemple solvant utilisé, volume de solution d'essai appliqué, anesthésiants utilisés;

— conception de l'essai, par exemple nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin : nombre de cages et nombre d'abeilles par cage;

— date de l'essai.

**2.2.4 Résultats :**

- résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant;
- données brutes : mortalité à chaque concentration testée et à chaque temps d'observation;
- courbes dose-effet à la fin de l'essai;
- valeurs de la DL<sub>50</sub> avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité;
- méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL<sub>50</sub>;
- mortalité chez les témoins;
- autres effets biologiques observés et toute réaction anormale des abeilles;
- tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

**3. BIBLIOGRAPHIE**

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

**C.18. DETERMINATION DE L'ADSORPTION/DESORPTION AU MOYEN DE LA METHODE PAR AGITATION****1. METHODE**

La méthode décrite reprend la ligne directrice n. 106 de l'OCDE sur l'adsorption/désorption dans les sols fondée sur la méthode par agitation (2000).

**1.1 INTRODUCTION**

La méthode s'inspire d'un test circulaire, d'un séminaire sur la sélection des sols pour le développement d'un essai d'adsorption (1) (2) (3) (4) et de certaines lignes directrices nationales (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Les études d'adsorption/désorption donnent des informations précieuses sur la mobilité des substances chimiques et leur répartition dans les trois compartiments de la biosphère (lithosphère, hydrosphère, atmosphère) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Ces informations servent à prédire et à évaluer certaines caractéristiques d'une substance : la capacité de dégradation (22) (23), de transformation et d'absorption par les organismes (24), la lixiviation à travers le sol (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), la volatilité à partir du sol (21) (29) (30), le ruissellement à la surface du sol vers les eaux naturelles (18) (31) (32). Les données sur l'adsorption peuvent être utilisées à des fins de comparaison ou de modélisation (19) (33) (34) (35).

La distribution d'une substance chimique entre les phases solides et aqueuses est un processus complexe qui dépend d'un grand nombre de facteurs : nature chimique de la substance (12) (36) (37) (38) (39) (40), caractéristiques du sol (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), mais aussi des conditions climatiques : précipitations, température, ensoleillement, vent. La méthode présentée ici, qui est un modèle de laboratoire simplifié, ne permet pas d'expliquer entièrement les phénomènes et les mécanismes impliqués dans l'adsorption d'une substance chimique par le sol. Mais si elle n'est pas exhaustive, elle donne tout de même d'utiles informations sur les effets environnementaux de l'adsorption d'un produit chimique.

Voir également l'introduction générale.

**1.2 OBJET DE LA METHODE**

La méthode vise à évaluer le comportement d'adsorption/désorption d'une substance dans les sols. Il s'agit d'obtenir une valeur de sorption permettant de prédire le partage d'une substance sous diverses conditions environnementales. Les coefficients d'adsorption à l'équilibre d'une substance chimique sur différents sols sont déterminés en fonction des caractéristiques du sol (par exemple teneur en carbone organique, teneur en argile, texture, pH). Il faut utiliser plusieurs types de sols pour couvrir le plus grand nombre possible d'interactions d'une substance donnée avec des sols naturels.

La présente méthode considère l'adsorption comme la liaison d'une substance chimique à la surface des sols. Elle ne fait pas de distinction entre les différents processus d'adsorption (adsorption physique et chimique) et d'autres processus tels que la dégradation catalysée par la surface, l'adsorption de masse ou la réaction chimique. Elle ne tient pas compte de l'adsorption sur les particules colloïdales (diamètre < 0.2 µm) générées par les sols.

Les paramètres considérés comme les plus importants pour l'adsorption sont : la teneur en carbone organique (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), la teneur en argile, la texture (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), le pH (pour les composés ionisables) (3) (4) (42). D'autres sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'adsorption : la capacité d'échange cationique réelle (CECR), la teneur en fer amorphe et en oxydes d'aluminium, notamment dans le cas des sols volcaniques et tropicaux (4), ainsi que la surface spécifique (49).

L'essai permet d'évaluer l'adsorption d'une substance chimique sur des sols de texture et de pH différents et n'ayant pas la même teneur en carbone organique et en argile. Il comprend trois phases :

**Phase 1 :** Etude préliminaire servant à déterminer :

- le rapport sol/solution;
- le temps d'équilibre de l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre;
- l'adsorption de la substance sur la surface des récipients d'essai et la stabilité de la substance durant l'essai.

**Phase 2 :** Essai de sélection : l'adsorption est étudiée sur cinq sols différents. On détermine la cinétique d'adsorption avec une concentration unique, ainsi que le coefficient de distribution  $K_d$  et  $K_{oc}$ .

**Phase 3 :** Détermination des isothermes d'adsorption de Freundlich : cet essai sert à évaluer l'effet de la concentration sur le degré d'adsorption sur les sols.

Etude de la désorption par l'évaluation de la cinétique et des isothermes de désorption de Freundlich (appendice 1).

## 1.3 DEFINITIONS ET UNITES

Symbole	Définition	Unités
$A_{t_i}$	pourcentage d'adsorption au temps $t_i$	%
$A_{eq}$	pourcentage d'adsorption à l'équilibre	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'instant $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_m^{ads}(eq)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g}$
$m_0$	masse de substance dans le tube au début de l'essai	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(t_i)$	masse de substance mesurée dans une aliquote ( $v_a^\wedge$ ) au temps $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g}$
$m_{sol}$	quantité de phase de sol exprimée en masse sèche du sol	g
$C_{st}$	concentration massique de la solution de réserve	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_0$	concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps $t_i$ , lorsque l'analyse est effectuée.	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_0$	volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai d'adsorption	$\text{cm}^3$
$v_a^\wedge$	volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée	$\text{cm}^3$
$K_d$	coefficient de répartition de l'adsorption	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{oc}$	coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{om}$	coefficient de la répartition normalisé basé sur la teneur en matière organique	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{ads}$	coefficient d'adsorption de Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	exposant de Freundlich	
$D_{t_i}$	pourcentage de désorption à l'instant $t_i$	%
$D_{\Delta t_i}$	pourcentage de désorption durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$	%
$K_{des}$	coefficient de désorption apparente	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{des}$	coefficient de désorption de Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant $t_i$	$\mu\text{g}$

Symbole	Définition	Unités
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_m^{des}(eq)$	masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des}(eq)$	masse totale de substance désorbée à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g}$
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masse de substance restant adsorbée sur le sol après l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^A$	masse de substance résiduelle après atteinte de l'équilibre d'adsorption due à un volume de remplacement insuffisant	$\mu\text{g}$
$C_s^{des}(eq)$	concentration de la substance restant adsorbée dans le sol à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_T$	volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	$\text{cm}^3$
$V_K$	volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume identique d'une solution de 0,01 M de $\text{CaCl}_2$	$\text{cm}^3$
$v_a^D$	volume de l'aliquote extrait du tube (i) pour analyse lors de l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	$\text{cm}^3$
$V_r^i$	volume de solution extrait du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (méthode parallèle)	$\text{cm}^3$
$V_r^e$	volume de solution extrait du tube afin de mesurer la substance à l'équilibre de désorption	$\text{cm}^3$
MB	bilan matière	%
$m_E$	masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du tube d'essai	$\mu\text{g}$
$V_{rec}$	volume de surnageant récupéré après l'équilibre d'adsorption	$\text{cm}^3$
$P_{ow}$	coefficient de partage octanol/eau	
$pK_a$	constante de dissociation	
$S_w$	solubilité dans l'eau	$\text{g l}^{-1}$

#### 1.4 PRINCIPE DE LA METHODE

Des volumes connus de la substance, non marquée ou radiologiquement marquée, mélangée à des concentrations connues de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sont ajoutés à des échantillons de sol d'un poids sec connu, préalablement équilibrés dans du  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. Le mélange est agité pendant le temps requis. Les particules du sol en suspension sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration, puis la phase aqueuse est analysée. La quantité de substance adsorbée sur le sol correspond à la différence entre la quantité de substance initialement présente dans la solution et la quantité restant à la fin de l'expérience (méthode indirecte).

La quantité de substance adsorbée peut également être directement calculée par l'analyse du sol (méthode directe). Cette méthode, qui consiste à extraire progressivement le sol au moyen d'un solvant approprié, est recommandée lorsque l'on ne peut pas déterminer avec précision les écarts de concentration de la substance dans la solution, par exemple dans les cas suivants : adsorption de la substance sur la surface des tubes d'essai, instabilité de la substance au cours de l'expérience, faible adsorption modifiant peu la concentration de la substance dans la solution, forte adsorption entraînant une faible concentration ne pouvant être mesurée avec précision. L'utilisation d'une substance radioactivement marquée permet d'éviter d'extraire le sol. On analyse dans ce cas la phase du sol par combustion et comptage à scintillation liquide. Cette dernière méthode, non spécifique, ne permet cependant pas de distinguer les produits primaires des produits de transformation. Elle ne devrait donc être utilisée que si la substance à tester reste stable pendant toute la durée de l'étude.



### 1.5 INFORMATION SUR LA SUBSTANCE

Les réactifs chimiques doivent être purs. On recommande l'emploi de substances non marquées de composition connue et présentant de préférence un degré de pureté d'au moins 95 % ou de substances radioactivement marquées de composition connue et radioactivement pures. Il faut appliquer des corrections pour tenir compte de la désintégration lorsque l'on emploie des traceurs à demi-vie courte.

Les paramètres suivants doivent être connus avant de réaliser un essai d'adsorption/désorption :

- a) solubilité dans l'eau (A.6.);
- b) pression de vapeur (A.4.) et/ ou constante de la loi d'Henry;
- c) dégradation non biologique : hydrolyse en fonction du pH (C.7.);
- d) coefficient de partage (A.8.);
- e) biodégradabilité facile (C.4.) ou transformation aérobie et anaérobie dans le sol;
- f)  $pK_a$  des substances ionisables;
- g) photolyse directe dans l'eau (c'est-à-dire spectre d'absorption UV-Vis dans l'eau, rendement quantique, p. ex.) et photodégradation sur le sol.

### 1.6 APPLICABILITE DE L'ESSAI

L'essai est applicable aux substances chimiques pour lesquelles on dispose d'une méthode analytique suffisamment précise. La stabilité de la substance durant l'essai est un paramètre important qui peut influencer la fiabilité des résultats, notamment avec la méthode indirecte. Il faut donc vérifier la stabilité par une étude préliminaire. Si l'on observe une transformation durant l'essai, il est recommandé d'analyser le sol et les phases aqueuses lors de l'étude principale.

Des difficultés peuvent survenir avec des substances faiblement solubles dans l'eau ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ) ou avec des substances fortement chargées du fait que la concentration de la phase aqueuse ne peut pas être mesurée avec suffisamment de précision avec la méthode analytique. Il faut prendre d'autres mesures dans ces cas. Les moyens d'aborder ces problèmes sont traités dans les points correspondants.

Il faut veiller à éviter les pertes si l'on analyse des substances volatiles.

### 1.7 MODE OPERATOIRE

#### 1.7.1 Appareillage, réactifs chimiques

Le laboratoire doit être équipé de l'équipement standard suivant :

- a) Tubes ou récipients d'essai. Il est important qu'ils soient :
  - adaptés à la centrifugeuse afin de diminuer les erreurs de manipulation et de transfert;
  - constitués d'un matériau inerte qui diminue l'adsorption de la substance sur les parois.
- b) Agitateur : agitateur vertical ou équipement équivalent; le sol doit être maintenu en suspension pendant l'agitation.
- c) Centrifugeuse : elle doit être de préférence à vitesse de rotation élevée (forces de centrifugation  $> 3\ 000g$ , p. ex.), à température contrôlée et capable d'éliminer de la solution aqueuse les particules d'un diamètre supérieur à  $0.2 \mu\text{m}$ . Les récipients doivent être fermés durant l'agitation et la centrifugation afin d'éviter les pertes par volatilité et les pertes en eau; il est recommandé d'utiliser des couvercles désactivés (couvercles filetés recouverts de téflon, p. ex.) afin de diminuer l'adsorption sur leur surface.
- d) Equipement facultatif : filtres stériles jetables d'une porosité de  $0.2 \mu\text{m}$ . Le matériau filtrant doit être choisi avec soin afin d'éviter l'adsorption de la substance à sa surface; les filtres organiques sont déconseillés pour les substances peu solubles.
- e) Instrumentation analytique permettant de mesurer la concentration de la substance.
- f) Four de laboratoire permettant de maintenir une température de  $103 \text{ }^\circ\text{C}$  à  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.7.2 Caractérisation et sélection des sols

Les sols doivent être caractérisés par les trois paramètres principalement responsables de la capacité d'adsorption : le carbone organique, la teneur en argile et la texture, le pH. Comme nous l'avons dit plus haut (voir le point « Objet de la méthode »), d'autres caractéristiques physico-chimiques peuvent influencer sur l'adsorption/désorption d'une substance et elles doivent donc être prises en compte.

Les méthodes de caractérisation des sols revêtent une extrême importance car elles peuvent influencer les résultats de manière significative. Il est donc recommandé de mesurer le pH du sol dans une solution de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$  (la solution utilisée lors de l'essai d'adsorption/désorption) selon la méthode ISO correspondante (ISO-10390-1). Il est également conseillé de déterminer certaines autres propriétés du sol selon les méthodes standard (par exemple manuel ISO de l'analyse des sols « Handbook of Soil Analysis »). On peut ainsi faire reposer l'analyse des données relatives à la sorption sur des paramètres de sol harmonisés. La bibliographie donne quelques références de méthodes harmonisées d'analyse et de caractérisation des sols (50-52). L'utilisation de sols de référence est recommandée pour calibrer les méthodes d'essai des sols.

Le tableau I indique comment choisir les sols pour les essais d'adsorption/désorption. Les sept types de sols choisis se rencontrent dans des zones géographiques tempérées. Pour les substances ionisables, les sols sélectionnés doivent couvrir un large spectre de pH pour permettre d'évaluer l'adsorption de la substance sous sa forme ionisée et non ionisée. Le point 1.9 (« Réalisation de l'essai ») indique combien de sols différents doivent être utilisés durant les diverses phases de l'essai.

Si d'autres types de sols sont choisis, il faut les caractériser au moyen des mêmes paramètres et ils doivent présenter des propriétés aussi diverses que celles décrites dans le tableau I, même s'ils ne remplissent pas tout à fait les critères.

Tableau 1 : Aide à la sélection des échantillons de sol pour les essais d'adsorption-désorption

Type de sol	pH (dans le CaCl <sub>2</sub> 0,01 M)	Teneur en carbone organique (%)	Teneur en argile (%)	Texture du sol (1)
1	4.5 - 5.5	1.0 - 2.0	65 - 80	argile
2	> 7.5	3.5 - 5.0	20 - 40	limon-argileux
3	5.5 - 7.0	1.5 - 3.0	15 - 25	limons fins
4	4.0 - 5.5	3.0 - 4.0	15 - 30	limon
5	< 4.0 - 6.0 (2)	< 0.5 - 1.5 (2) (3)	< 10 - 15 (2)	sable-limoneux
6	> 7.0	< 0.5 - 1.0 (2) (3)	40 - 65	Limon-argileux / argile
7	< 4.5	> 10	< 10	sable/sable glaiseux

(1) Selon la FAO et le système américain (85)

(2) Les valeurs des variables doivent être comprises de préférence dans les limites du spectre indiqué. En cas de difficulté à trouver un sol approprié, des valeurs inférieures au minimum indiqué sont acceptées.

(3) Les sols contenant moins de 0,3 % de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en carbone organique et l'adsorption. Il est donc recommandé d'utiliser des sols présentant une teneur supérieure à 0,3 %.

### 1.7.3 Collecte et stockage des échantillons de sols

#### 1.7.3.1 Collecte

Aucune technique ou instrument d'échantillonnage particulier n'est recommandée; la technique d'échantillonnage dépend des objectifs de l'étude (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Il convient de considérer les aspects suivants :

a) il faut disposer d'informations détaillées sur le site d'essai : localisation, couverture végétale, traitement aux pesticides et/ou aux engrais, adjuvants biologiques ou contamination accidentelle. Le site doit être décrit selon les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6).

b) le site d'échantillonnage doit être défini par l'UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ou par des coordonnées géographiques, de manière à pouvoir reconnaître ultérieurement un sol particulier ou à définir un sol en fonction des divers systèmes de classification utilisés dans les différents pays. Il est également recommandé de prélever dans l'horizon A jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm. Si un horizon O<sub>h</sub> est présent dans le sol n° 7 en particulier, il doit être inclus dans l'échantillon.

Les échantillons sont transportés dans des conteneurs et dans des conditions thermiques propres à préserver au mieux les propriétés initiales du sol.

#### 1.7.3.2 Stockage

Il est préférable d'utiliser des sols fraîchement prélevés. Si cela n'est pas possible, le sol peut être stocké à la température ambiante et maintenu au sec. Aucun temps de stockage maximal n'est recommandé, mais au-delà de trois ans, les sols doivent être à nouveau analysés avant l'emploi afin de vérifier leur teneur en carbone organique, leur pH et leur C.E.C.

#### 1.7.3.3 Manipulation et préparation des échantillons d'essai

Les sols sont séchés à l'air à la température ambiante (de préférence entre 20 à 25 °C). Ils sont désagrégés en appliquant des forces minimales de manière à modifier aussi peu que possible la texture originale, puis tamisés pour ne conserver que les particules ≤ 2 mm. Le tamisage doit respecter les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6). Une bonne homogénéisation est recommandée car elle améliore la reproductibilité des résultats. La teneur en eau de chaque sol est déterminée à partir de trois aliquotes par un réchauffement à 105 °C jusqu'à stabilisation du poids (environ 12h). Pour tous les calculs, la masse du sol se réfère à la masse sèche à l'étuve, c'est-à-dire au poids de sol diminué de la teneur en eau.

### 1.7.4 Préparation de la substance d'essai devant être appliquée sur le sol

La substance d'essai est dissoute dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée; la solution de CaCl<sub>2</sub> est utilisée comme solvant aqueux pour améliorer la centrifugation et diminuer les échanges de cations. La concentration de la solution mère doit être supérieure de 3 ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode d'analyse utilisée. Ce seuil permet de faire des mesures précises avec la méthodologie employée lors de l'essai. Enfin, la concentration de la solution de réserve doit être inférieure à la solubilité dans l'eau de la substance.

Il est conseillé de préparer la solution de réserve immédiatement avant de l'appliquer sur le sol et de la conserver dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à une température de 4 °C. La durée de stockage dépend de la stabilité de la substance et de sa concentration dans la solution.

Un agent solubilisant peut être utilisé pour les substances peu solubles ( $S_w < 10^{-4}$  g l<sup>-1</sup>) qui se dissolvent difficilement. Il doit être miscible avec l'eau, comme le méthanol ou l'acétonitrile; sa concentration ne doit pas dépasser 1 % du volume total de la solution de réserve et elle doit être inférieure à celle de la substance dans la solution qui entrera en contact avec le sol (de préférence moins de 0,1 %); il ne doit pas être un surfactant ou subir des réactions solvolytiques avec la substance d'essai. Le procès-verbal d'essai doit indiquer qu'un tel agent a été employé et en donner les raisons.

Un autre moyen de traiter les substances peu solubles consiste à introduire la substance d'essai dans le système d'essai à l'aide d'un solvant auxiliaire : la substance est dissoute dans un solvant organique, dont une fraction est ajoutée au système constitué par le sol et par une solution 0,01M de CaCl<sub>2</sub> dans de l'eau distillée ou désionisée. La concentration du solvant organique dans la phase aqueuse devrait être aussi faible que possible et ne pas excéder en principe 0,1 %. L'expérimentateur devra toutefois tenir compte du fait que l'introduction de la substance à l'aide d'une solution organique est susceptible de nuire à la reproductibilité des volumes. La concentration de la substance d'essai et du solvant auxiliaire risquent donc de varier légèrement entre les essais et d'introduire une erreur supplémentaire.

## 1.8 CONDITIONS PREALABLES A LA REALISATION DE L'ESSAI D'ADSORPTION/DESORPTION

## 1.8.1 Méthode analytique

Un certain nombre de paramètres peuvent influencer la précision des mesures : la précision de la méthode d'analyse de la solution et des phases adsorbées, la stabilité et la pureté de la substance, le temps pour atteindre l'équilibre de sorption, l'étendue des variations de concentration de la solution, le rapport sol/solution et les modifications de la structure du sol au cours du processus d'équilibrage (35) (59-62). L'appendice 2 donne quelques exemples à ce propos.

La fiabilité de la méthode d'analyse doit être vérifiée selon la gamme de concentration susceptible d'être celle rencontrée durant l'essai. L'expérimentateur est libre d'élaborer une méthode appropriée présentant toutes les qualités requises en matière de précision, d'exactitude, de reproductibilité, de limites de détection et de récupération. L'expérience ci-dessous montre comment effectuer un tel essai.

Un volume approprié de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (100  $\text{cm}^3$  p. ex.), est agité pendant 4 h avec un certain poids de sol (20 g, p. ex.) hautement adsorbant, c'est-à-dire riche en carbone organique et en argile. Le poids et le volume varient selon les besoins de l'analyse mais un rapport sol/solution de 1 : 5 constitue un bon point de départ. Le mélange est centrifugé et la phase aqueuse filtrée. Une partie de la solution de réserve de la substance est ajoutée à cette dernière afin d'obtenir une concentration nominale comprise dans la gamme de concentration correspondant à celle de l'essai. Ce volume ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de pré-équilibre. La solution est ensuite analysée.

Un témoin constitué du système du sol et de la solution de  $\text{CaCl}_2$  (sans substance d'essai) doit être ajouté afin de vérifier les artefacts de la méthode d'analyse et les effets de matrice induits par le sol.

La chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectrométrie (CG/spectrométrie de masse, HPLC /spectrométrie de masse) et le comptage à scintillation liquide (pour les substances radiologiquement marquées) figurent parmi les méthodes de mesure de la sorption. Un taux de récupération de 90 à 110 % de la valeur nominale est jugé satisfaisant quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. La limite de détection de la méthode d'analyse doit être d'au moins de deux ordres de grandeur inférieure à la concentration nominale afin de permettre la détection et l'évaluation une fois que le partage est effectué.

Les caractéristiques et la limite de détection de la méthode utilisée pour effectuer les études d'adsorption déterminent les conditions d'essai et les résultats expérimentaux. La méthode présentée ici suit un protocole expérimental général et propose des solutions de rechange lorsque la méthode analytique ou les équipements de laboratoire imposent des limites.

## 1.8.2 Choix de rapports sol/solution optimums

Les rapports sol/solution appropriés à l'étude de la sorption sont choisis en fonction du coefficient de répartition  $K_d$  et du degré relatif d'adsorption souhaité. Le changement de la concentration de la substance dans la solution détermine la précision statistique de la mesure, fondée sur la forme de l'équation d'adsorption et sur la limite de la méthode d'analyse, ainsi que l'exactitude avec laquelle elle permettra de détecter la substance contenue dans la solution. Il est donc utile de déterminer plusieurs rapports fixes présentant un pourcentage adsorbé supérieur à 20 % ou, de préférence, à 50 % (62), tout en veillant à ce que la concentration de la substance dans la phase aqueuse reste suffisamment élevée pour pouvoir être mesurée avec précision, notamment lorsque les pourcentages d'adsorption sont importants.

Une solution pratique consiste à choisir les rapports sol/solution en estimant la valeur du coefficient de répartition  $K_d$  lors d'études préliminaires ou par des techniques d'estimation bien établies (voir l'appendice 3). On peut ensuite porter sur un graphique le rapport sol/solution en fonction du coefficient de distribution pour différents pourcentages fixes d'adsorption (fig.1). Dans le graphique ci-dessous, on estime que l'équation d'adsorption est linéaire <sup>(1)</sup> La relation est obtenue en réécrivant l'équation (4) du  $K_d$  sous la forme suivante (1) :

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left( \frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

ou sous sa forme logarithmique, en supposant que  $R = m_{\text{soil}}/V_0$  et  $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$  :

$$\log R = -\log K_d + \log \left[ \frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1 - A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$

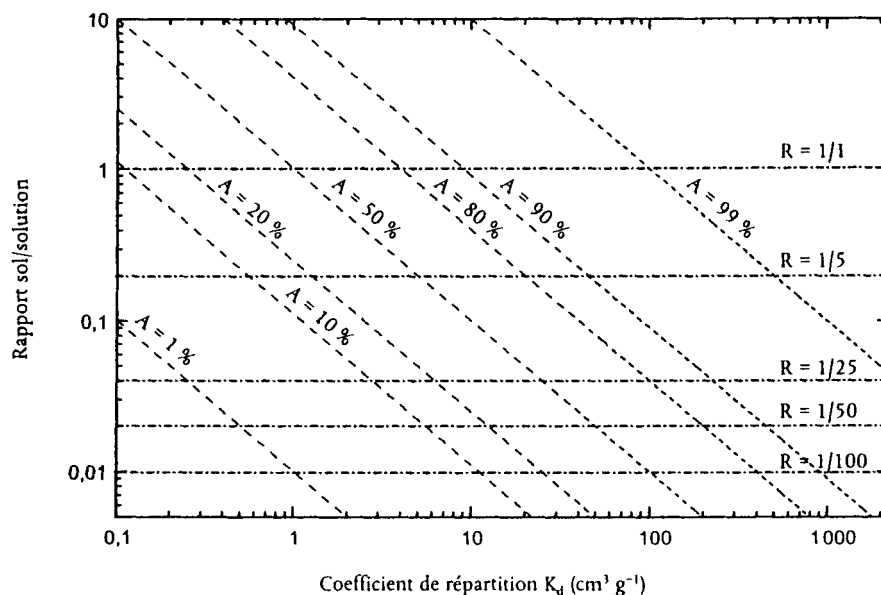


Figure 1 Relation entre les rapports sol/solution et  $K_d$  pour différents pourcentages d'adsorption de la substance

La figure 1 montre le rapport sol/solution requis en fonction de  $K_d$  pour divers niveaux d'adsorption. Par exemple, avec un rapport sol/solution de 1 : 5 et un  $K_d$  de 20, l'adsorption serait de 80 % environ. Pour obtenir un pourcentage d'adsorption de 50 % avec le même  $K_d$ , il faudrait un rapport de 1 : 25. Cette méthode souple permet de choisir les rapports sol/solution en fonction des besoins de l'expérience.

Les zones où la substance est très fortement ou très légèrement adsorbée sont plus difficiles à maîtriser. En cas de faible absorption, un rapport sol/solution de 1 : 1 est recommandé, mais des ratios plus faibles peuvent être nécessaires avec certains types de sols très organiques afin d'obtenir une boue. Avec la méthode analytique, il faut veiller à mesurer les légères variations de concentration de la substance, faute de quoi la mesure d'adsorption sera inexacte. Avec un coefficient de distribution  $K_d$  très élevé, on peut aller jusqu'à un rapport de 1 : 100 de manière à conserver une quantité importante de substance en solution. Il faut cependant bien mélanger et donner au système le temps de s'équilibrer. On peut aussi prédire la valeur  $K_d$  au moyen de techniques d'estimation fondées par exemple sur la valeur  $P_{ow}$  (voir l'appendice 3). Cette méthode peut être utile pour les substances chimiques polaires ou faiblement adsorbées ayant un  $P_{ow} < 20$  et pour les substances lipophiles ou fortement sorbantes dotées d'un  $P_{ow} > 10^4$ .

## 1.9 REALISATION DE L'ESSAI

### 1.9.1 Conditions de l'essai

Les essais sont réalisés à température ambiante et, si possible, à une température constante comprise entre 20 et 25 °C.

La centrifugation doit permettre d'éliminer de la solution les particules supérieures à 0,2 µm. Cette valeur correspond à la plus petite particule considérée comme une particule solide et constitue la limite entre les particules solides et les colloïdes. L'appendice 4 explique comment déterminer les paramètres de la centrifugation.

Si l'équipement de centrifugation ne permet pas d'éliminer à coup sûr les particules supérieures à 0,2 µm, on peut combiner la centrifugation et la filtration avec des filtres de 0,2 µm. Ces filtres doivent être fabriqués en matériau inerte afin d'éviter les pertes de substance. Il faut dans tous les cas apporter la preuve qu'il n'y a aucune perte de substance au cours de la filtration.

### 1.9.2 Phase 1 - Etude préliminaire

Le but de l'étude préliminaire a déjà été expliqué dans le point « Objet de la méthode ». La réalisation de l'essai est exposée ci-après.

#### 1.9.2.1 Sélection de rapports sol/solution optimums

On utilise deux types de sols et trois rapports sol/solution (six essais). Un sol a une teneur en carbone organique élevée et une faible teneur en argile, l'autre une faible teneur en carbone organique et une teneur élevée en argile. Les rapports suivants sont proposés :

- 50 g de sol et 50 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1 : 1);
- 10 g de sol et 50 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1 : 5);
- 2 g de sol et 50 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1 : 25).

La quantité minimale de sol qui va servir à l'expérience dépend de l'équipement de laboratoire dont on dispose et des performances des méthodes analytiques utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser au moins 1 g, de préférence 2 g, afin d'obtenir des résultats d'essai fiables.

Un échantillon de contrôle contenant uniquement la substance d'essai dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (sans sol) est soumise exactement aux mêmes opérations que le système d'essai afin de vérifier la stabilité de la substance dans une solution de CaCl<sub>2</sub> et son adsorption éventuelle à la surface des récipients d'essai.

Un témoin par sol contenant la même quantité de sol dans un volume total de 50 cm<sup>3</sup> de solution de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (sans substance) est soumis à la même procédure d'essai. Il permet de détecter les substances étrangères ou les sols contaminés.

Tous les essais, contrôles et témoins sont réalisés au moins en double. Le nombre total d'échantillons devant être préparés pour l'étude est calculé selon la méthode suivie.

L'étude préliminaire et l'étude principale reposent sur les mêmes méthodes, sauf indication contraire.

Les échantillons de sols séchés à l'air sont mélangés à un volume minimum de 45 cm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M et agités pendant 12 h la nuit précédant l'expérience. On y ajoute par la suite de la solution de réserve de la substance d'essai afin d'obtenir un volume final de 50 cm<sup>3</sup>. Ce volume ajouté ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse (50 cm<sup>3</sup>) afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de pré-équilibre. Par ailleurs, la concentration initiale de la substance d'essai en contact avec le sol ( $C_0$ ) doit être supérieure d'au moins deux ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode analytique. Ce seul permet d'obtenir des mesures fiables, même en cas d'adsorption élevée (> 90 %) et de déterminer ultérieurement les isothermes d'adsorption. La concentration ( $C_0$ ) de la substance initiale ne devrait pas non plus excéder la moitié de sa limite de solubilité.



Voici comment calculer la concentration de la solution de réserve ( $C_{st}$ ). Si la limite de détection est de  $0.01 \mu\text{g cm}^{-3}$  et l'adsorption de 90 %, la concentration initiale de la substance en contact avec le sol sera de préférence de  $1 \mu\text{g cm}^{-3}$  (soit de deux ordres de grandeur plus élevée que celle de la limite de détection). En supposant que l'on ajoute le volume maximum recommandé de la solution de réserve, soit  $5 \text{ cm}^3$ , aux  $45 \text{ cm}^3$  de la solution d'équilibrage de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$  (c.-à-d. 10 % de la solution de réserve au volume total de la phase aqueuse), la concentration de la solution de réserve sera de  $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ , ce qui est de trois ordres de grandeur supérieur à la limite de détection de la méthode analytique.

Il faut mesurer le pH de la phase aqueuse avant et après le contact avec le sol, compte tenu de son rôle dans le processus d'adsorption, notamment dans le cas des substances ionisables.

Le mélange est agité jusqu'à ce que le point d'équilibre soit atteint. Le temps d'équilibre dans les sols est très variable. Il dépend du produit chimique et du sol. Une période de 24 heures est généralement suffisante (77). Lors de l'étude préliminaire, des échantillons peuvent être prélevés de manière séquentielle pendant une période de mélange de 48 h (à la 4<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup>, 24<sup>e</sup> et 48<sup>e</sup> heure, p. ex.). Les temps d'analyse ne sont pas rigides et doivent être considérés en fonction du programme de travail du laboratoire.

La substance dans la solution aqueuse peut être mesurée par la méthode parallèle ou par la méthode séquentielle. La méthode parallèle est plus difficile à réaliser sur le plan expérimental mais le traitement mathématique des résultats est plus simple (voir l'appendice 5). Le choix de la méthode est laissée à l'appréciation de l'expérimentateur qui décide en fonction des équipements de laboratoire et des ressources disponibles.

(a) méthode parallèle : on prépare des échantillons avec un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique d'adsorption. Après centrifugation et, le cas échéant, filtration, la phase aqueuse du premier tube est récupérée aussi complètement que possible et mesurée au bout de 4 h, par exemple, celle du deuxième tube au bout de 8 h, celle du troisième au bout de 24 h, etc.

(b) méthode séquentielle : on prépare uniquement un double échantillon pour chaque rapport sol/solution. Le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance, puis l'expérience se poursuit avec le mélange original. S'il y a une filtration après centrifugation, le laboratoire doit disposer d'équipements permettant de filtrer de petites aliquotes en phase aqueuse. Le volume total des aliquotes ne devrait pas dépasser 1 % du volume total de la solution afin de ne pas modifier de manière significative le rapport sol/solution et de diminuer la masse de soluté susceptible d'être adsorbée durant l'essai.

Le pourcentage d'adsorption  $A_{ti}$  est calculé à chaque instant ( $t_i$ ) sur la base de la concentration initiale nominale et de la concentration mesurée au temps d'échantillonnage ( $t_i$ ), corrigé de la valeur du témoin. Des graphes représentant  $A_{ti}$  en fonction du temps (fig. 1, appendice 5) sont tracés afin de savoir à quel moment le plateau d'équilibre est atteint (%). On calcule également la valeur  $K_d$  à l'équilibre. On choisit à partir de cette valeur le rapport sol/solution approprié de la figure 1, de manière que le pourcentage d'adsorption dépasse 20 % et, de préférence, 50 % (61). Les équations et les principes relatifs au tracé sont exposés dans le point « Présentation des données », ainsi qu'à l'appendice 5.

#### 1.9.2.2 Détermination du temps d'adsorption et de la quantité de substance adsorbée à l'équilibre

Comme nous l'avons déjà dit, le graphe représentant  $A_{ti}$  ou  $C_{aq}^{ads}$  en fonction du temps permet d'estimer l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre (voir les figures 1 et 2 de l'appendice 5). Le temps d'équilibre correspond au temps que le système met pour atteindre un plateau.

L'absence de plateau ou l'accroissement progressif de la courbe peut être dû à des facteurs complexes tels que la biodégradation ou une diffusion lente. La biodégradation peut être mise en évidence en répétant l'expérience avec un échantillon de sol stérile. Si aucun plateau n'est atteint même dans ce cas, l'expérimentateur doit chercher d'autres causes inhérentes à l'étude. Il peut par exemple modifier les conditions de l'essai (température, temps d'agitation, rapport sol/solution). Lui seul décide de poursuivre la procédure d'essai, même s'il court le risque de ne pas atteindre un équilibre.

#### 1.9.2.3 Adsorption sur les parois du récipient et stabilité de la substance

L'analyse des échantillons de contrôle peut fournir quelques informations sur l'adsorption de la substance sur les parois des récipients d'essai, ainsi que sur sa stabilité. Une déplétion supérieure à l'écart-type de la méthode analytique peut être due à une dégradation abiotique et/ou à l'adsorption sur les parois du récipient. On peut individualiser l'un ou l'autre de ces phénomènes en lavant soigneusement les parois du récipient avec un volume connu de solvant, puis en recherchant la substance dans la solution de lavage. L'absence d'adsorption sur les parois du récipient prouve l'instabilité abiotique de la substance. En cas d'adsorption, en revanche, il convient de modifier le matériau du récipient d'essai. Ces données sur l'adsorption sur les parois des récipients d'essai ne peuvent cependant pas être directement extrapolées à l'essai sol/solution, dans la mesure où la présence de sol modifie l'adsorption.

On peut obtenir des informations supplémentaires sur la stabilité de la substance d'essai en déterminant le bilan matière dans le temps. La substance est recherchée dans la phase aqueuse, dans les extraits de sol et sur les parois des récipients d'essai. La différence entre la masse de la substance ajoutée et la somme des masses de substance présentes dans la phase aqueuse, les extraits de sol et sur les parois des récipients correspond à la masse dégradée, volatilisée et/ou non extraite. Pour effectuer un bilan matière, l'équilibre d'adsorption doit être atteint durant l'essai.

Le bilan matière est effectué sur les deux sols et avec un rapport sol/solution par sol générant une déplétion à l'équilibre supérieure à 20 % et, de préférence, à 50 %. Une fois que l'essai consistant à trouver le rapport sol/solution est terminé (analyse du dernier échantillon de phase aqueuse au bout de 48h), les phases sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration. Le maximum de phase aqueuse est récupérée puis un solvant d'extraction approprié (c.-à-d. doté d'un coefficient d'extraction d'au moins 95 %) est ajouté au sol afin d'extraire la substance. Deux extractions successives au moins sont recommandées. On détermine ensuite la quantité de substance présente dans les extraits de sol et dans le récipient afin de calculer le bilan matière (équation 10 du point « Présentation des données »). S'il est inférieur à 90 %, la substance est jugée instable durant la durée de l'essai. Les études peuvent être cependant poursuivies en tenant compte de cette instabilité. Il est conseillé dans ce cas d'analyser les deux phases lors de l'étude principale.

#### 1.9.3 Phase 2 - Cinétique d'adsorption avec une concentration unique de substance

Cinq sols choisis dans le tableau 1 sont utilisés à cet effet. On a intérêt à y inclure tout ou partie des sols utilisés dans l'étude préliminaire. Dans ce cas, ils ne sont pas soumis aux essais de la phase 2.

Le temps d'équilibrage, le rapport sol/solution, le poids de l'échantillon de sol, le volume de la phase aqueuse en contact avec le sol et la concentration de la substance d'essai dans la solution sont choisis en fonction des résultats de l'étude préliminaire. L'analyse doit être effectuée de préférence après un temps de contact de 2, 4, 6, 8 (éventuellement 10) et 24 h. Le temps d'agitation peut être étendu à 48 h maximum lorsque les résultats sur le rapport sol/solution font ressortir un temps d'équilibrage plus long. Les temps d'analyse doivent être considérés avec une certaine souplesse.

Chaque expérience (un sol et une solution) est effectuée au moins en double afin d'évaluer la variance des résultats. Un témoin est préparé pour chacune d'elle avec du sol et de la solution de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$ , sans substance d'essai, d'un poids et d'un volume identiques aux échantillons d'essai. Un échantillon de contrôle préparé uniquement à partir de la substance d'essai contenue dans une solution de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$  (sans sol) est soumis à la même procédure d'essai afin de se prémunir contre l'imprévu.



Le pourcentage d'adsorption est calculé à chaque instant  $A_{ti}$  et/ou intervalle de temps  $A_{\Delta ti}$  (selon les besoins). Il est porté sur un graphe en fonction du temps. Le coefficient de distribution  $K_d$  à l'équilibre ainsi que le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique  $K_{oc}$  (pour les substances chimiques non polaires) sont également calculés.

#### Résultats de l'essai de cinétique d'adsorption

La valeur linéaire  $K_d$ , qui exprime la mobilité inhérente des substances chimiques dans le sol, est généralement suffisamment précise pour décrire le comportement de sorption du sol (35) (78). Les substances chimiques dont  $K_d$  est  $\leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  sont en général considérées comme étant mobiles. Mac Gall et coll. ont élaboré un système de classification de la mobilité fondé sur les valeurs  $K_{oc}$  (16). Il existe également des systèmes de classification de la lixiviation fondés sur la relation entre  $K_{oc}$  et  $DT-50^{(3)}$  (32) (79).

Selon les études d'analyse d'erreurs (61), les valeurs  $K_d$  inférieures à  $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  ne peuvent pas être estimées avec précision à partir d'une diminution de la concentration dans la phase aqueuse, même si l'on applique le rapport sol/solution le plus favorable (sur le plan de la précision), c'est-à-dire 1 :1. Dans ce cas, l'analyse des deux phases (sol et solution) est recommandée.

En ce qui concerne les remarques précédentes, il est conseillé de poursuivre l'étude du comportement de sorption d'un produit chimique dans le sol et de sa mobilité potentielle en déterminant les isothermes d'adsorption de Freundlich des systèmes dont on peut déterminer précisément  $K_d$  grâce au protocole expérimental suivi dans la présente méthode. Il suffit pour cela que la valeur obtenue en multipliant  $K_d$  avec le rapport sol/solution soit  $> 0,3$  - lorsque les mesures reposent sur la baisse de concentration de la phase aqueuse (méthode indirecte) - ou  $> 0,1$  lorsque les deux phases sont analysées (méthode directe) (61).

### 1.9.4 Phase 3 - Isothermes d'adsorption, cinétique de désorption et isothermes de désorption

#### 1.9.4.1 Isothermes d'adsorption

On utilise cinq concentrations de substances d'essai couvrant de préférence deux ordres de grandeur. La solubilité dans l'eau et les concentrations à l'équilibre de la phase aqueuse qui en résultent sont prises en compte lors du choix de ces concentrations. Il convient de garder le même rapport sol/solution par sol tout au long de l'étude. L'essai d'adsorption est effectué selon la description ci-dessus, à la différence près que la phase aqueuse est analysée une seule fois, au moment où le point d'équilibre déterminé au cours de la phase 2 est atteint. Les concentrations à l'équilibre dans la solution sont déterminées et la quantité adsorbée est calculée à partir de la déplétion de la substance dans la solution ou avec la méthode directe. La masse adsorbée par unité de masse de sol est portée sur un graphique en fonction de la concentration à l'équilibre de la substance (voir le point « Présentation des données »).

#### Résultats de l'essai relatif aux isothermes d'adsorption

De tous les modèles mathématiques d'adsorption proposés jusqu'à présent, l'isotherme de Freundlich est le plus fréquemment utilisé pour décrire les processus d'adsorption. On peut trouver de plus amples informations sur l'interprétation et l'importance des modèles d'adsorption dans la bibliographie (41) (45) (80) (81) (82).

**Remarque** : il est bon de mentionner qu'une comparaison des valeurs  $K_F$  (coefficient d'adsorption de Freundlich) de différentes substances n'est possible que si ces valeurs sont exprimées en unités identiques (83).

#### 1.9.4.2 Cinétique de désorption

Cet essai vise à évaluer le caractère réversible ou irréversible de l'adsorption d'une substance sur un sol. C'est une information importante dans la mesure où le processus de désorption joue un rôle non négligeable dans le comportement d'une substance chimique dans un sol. Ces données sur la désorption peuvent également servir à élaborer des modèles informatisés de simulation du lessivage et de l'écoulement des substances dissoutes. Si l'on souhaite effectuer une étude de désorption, il est conseillé d'effectuer l'étude ci-après pour tous les systèmes dont on aura pu déterminer  $K_d$  au cours de l'essai sur la cinétique d'adsorption précédent.

Comme pour l'étude sur la cinétique d'adsorption, l'essai sur la cinétique de désorption peut se faire selon la méthode parallèle ou la méthode séquentielle. Le choix de la méthode est laissé à l'appréciation de l'expérimentateur, qui devra considérer les disponibilités en équipements de laboratoire et en ressources.

a) méthode parallèle : on prépare, pour chaque sol inclus dans l'étude de désorption, des échantillons ayant un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique de désorption. Il est préférable d'utiliser les mêmes intervalles de temps que pour l'étude sur la cinétique d'adsorption. Le temps total peut cependant être étendu de manière que le système parvienne à l'équilibre de désorption. On prépare un témoin pour chaque expérience (un sol, une solution) à partir de sol et d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans substance d'essai), d'un poids et d'un volume identiques à ceux de l'expérience. La substance d'essai dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sans sol) est soumise à la même procédure d'essai en tant qu'échantillon de contrôle. Tous les mélanges sol/solution sont agités jusqu'à l'équilibre d'adsorption (tel qu'il a été déterminé dans la phase 2). Les phases sont ensuite séparées par centrifugation et les phases aqueuses sont extraites le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ne contenant pas de substance d'essai et ces mélanges sont à nouveau agités. La phase aqueuse du premier tube est récupérée le plus complètement possible puis mesurée après 2 h, par exemple, celle du deuxième tube après 4 h, celle du troisième après 6 h, etc., jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint.

b) méthode séquentielle : après l'essai de cinétique d'adsorption, le mélange est centrifugé et la phase aqueuse est extraite le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M sans substance d'essai. Ce mélange est agité jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint. Pendant ce temps, le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance d'essai, puis on poursuit l'expérience avec le mélange original. Le volume de chaque aliquote ne devrait pas dépasser 1% du volume total. La même quantité de solution fraîche de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M est ajoutée au mélange afin de maintenir le rapport sol/solution, puis celui-ci est agité jusqu'au prochain intervalle de temps.

Le pourcentage de désorption est calculé à chaque temps  $D_{ti}$  et/ou intervalle de temps  $D_{\Delta ti}$  (selon les besoins de l'étude), puis il est porté sur un graphique en fonction du temps. Le coefficient de désorption  $K_{des}$  à l'équilibre est également calculé. Toutes les équations applicables sont données dans le point « Présentation des données » de l'appendice 5.

#### Résultats de l'essai de cinétique de désorption

L'inscription sur un même graphique du pourcentage de désorption  $D_{ti}$  et d'adsorption  $A_{ti}$  en fonction du temps permet d'estimer la réversibilité du processus d'adsorption. L'adsorption est jugée réversible si l'équilibre de désorption est atteint avant le double de temps nécessaire à l'équilibre d'adsorption et si la désorption totale est supérieure à 75 % de la quantité adsorbée.

### 1.9.4.3 Isothermes de désorption

Les isothermes de désorption de Freundlich sont déterminés sur les sols utilisés lors de l'expérience relative aux isothermes d'adsorption. L'essai de désorption est réalisé selon les modalités décrites dans le point « Cinétique de désorption », à la différence près que la phase aqueuse n'est analysée qu'une fois, à l'équilibre de désorption. On calcule ensuite la quantité de substance désorbée. La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est portée sur un graphe en fonction de la concentration d'équilibre de la substance d'essai en solution (voir le point « Présentation des données » et l'appendice 5).

## 2. PRESENTATION DES DONNEES

Les données analytiques sont présentées sous forme de tableaux (voir l'appendice 6) dans lesquels figurent les mesures et les moyennes calculées. Les isothermes d'adsorption sont représentés sous forme de graphiques. Les calculs sont effectués selon les modalités présentées ci-après.

Pour les besoins de l'essai, on estime que le poids de 1 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse est de 1g. Le rapport sol/solution peut être exprimé en M/M ou M/vol.

### 2.1 ADSORPTION

L'adsorption ( $A_t$ ) est définie comme le pourcentage de substance adsorbée sur le sol en fonction de la quantité présente au début de l'essai, dans les conditions de l'essai. Si la substance est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur la paroi du récipient,  $A_t$  est calculé à chaque instant  $t_i$  selon l'équation suivante:

$$A_t = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

où:

$A_t$  = est le pourcentage d'adsorption à l'instant  $t_i$  (%);

$m_s^{ads}(t_i)$  = est la masse de substance d'essai adsorbée sur le sol durant le temps  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = est la masse de substance dans le tube au début de l'essai ( $\mu\text{g}$ ).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur le mode de calcul du pourcentage d'adsorption  $A_t$  avec les méthodes parallèles et séquentielles.

Le coefficient de répartition  $K_d$  est le rapport entre le contenu de la substance dans le sol et sa concentration massique dans la solution aqueuse, dans les conditions d'essai, lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint, soit:

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

où:

$C_s^{ads}(eq)$  = est la concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$C_{aq}^{ads}(eq)$  = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ). Elle est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins.

$m_s^{ads}(eq)$  = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = est la masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{soil}$  = est la quantité de phase de sol exprimée en masse sèche de sol (g);

$V_0$  = est le volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol (cm<sup>3</sup>).

La relation entre  $A_{eq}$  et  $K_d$  est donnée par l'équation suivante:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \frac{V_0}{m_{soil}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (5)$$

où:

$A_{eq}$  = est le pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

Le coefficient normalisé basé sur la teneur en carbone organique  $K_{oc}$  lie le coefficient de répartition  $K_d$  à la teneur en carbone organique de l'échantillon de sol, soit:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

où:

$\%OC$  = est le pourcentage de carbone organique dans l'échantillon de sol (g g<sup>-1</sup>).

Le coefficient  $K_{oc}$  représente une valeur unique qui caractérise principalement le partage de substances chimiques non polaires entre le carbone organique dans le sol ou sédiment et eau. L'adsorption de ces substances est liée à la teneur organique du solide adsorbant (7); les valeurs  $K_{oc}$  dépendent donc des caractéristiques spécifiques des fractions humiques dont la capacité de sorption varie considérablement selon l'origine, la genèse, etc.

### 2.1.1. Isothermes d'adsorption

L'équation des isothermes d'adsorption de Freundlich lie la quantité de substance adsorbée à la concentration de substance en solution à l'équilibre (équation 8).

Les données sont traitées comme dans le point «Adsorption». On calcule pour chaque tube d'essai la quantité de la substance adsorbée sur le sol après l'essai d'adsorption  $C_s^{ads}(eq)$ , noté ailleurs  $x/m$ .

On suppose que l'équilibre a été atteint et que  $C_s^{ads}(eq)$  représente la valeur d'équilibre:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (7)$$

L'adsorption de Freundlich est donnée par l'équation suivante (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_f^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

ou, sous sa forme linéaire, par:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_f^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

où:

$K_f^{ads}$  = est le coefficient d'adsorption de Freundlich; il se mesure en cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> uniquement si 1/n = 1; dans tous les autres cas, la pente 1/n s'écrit  $K_f^{ads} (\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1})$ ;

$n$  = est la constante de régression; 1/n est généralement compris entre 0,7 et 1,0, ce qui indique que la donnée de sorption est fréquemment légèrement non linéaire.

Les équations 8 et 9 sont portées sur un graphique et les valeurs  $K_f^{ads}$  et 1/n sont calculées au moyen d'une analyse de régression utilisant l'équation 9. Le coefficient de corrélation  $r^2$  de l'équation logarithmique est également calculé. La figure 2 donne des exemples de graphes.

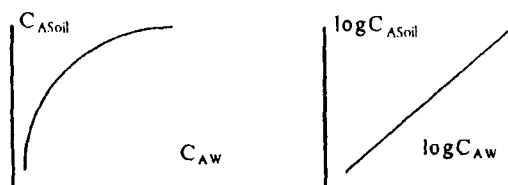


Figure 2. Graphique d'adsorption de Freundlich, normalisé et linéarisé

### 2.1.2. Bilan matière

Le bilan matière (MB) correspond au pourcentage de substance récupéré par analyse après un essai d'adsorption par rapport à la quantité nominale de substance présente au début de l'essai.

Le traitement des données est différent si le solvant est complètement miscible avec l'eau. On peut dans ce cas appliquer le traitement des données visé au point «Désorption» pour déterminer la quantité de substance extraite par solvant. Si celui-ci est moins miscible avec l'eau, il convient de déterminer la quantité récupérée.

Le bilan matière de l'adsorption est calculé de la manière suivante: on suppose que le terme ( $m_E$ ) correspond à la somme des masses de substance extraites du sol et de la surface du récipient d'essai au moyen d'un solvant organique, soit:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

où:

MB = est le bilan matière (%);

$m_E$  = est la masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du récipient ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = est la concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

$V_{rec}$  = est le volume de surnageant récupéré à l'équilibre d'adsorption ( $\text{cm}^{-3}$ ).

### 2.2. DÉSORPTION

La désorption (D) est définie comme le pourcentage de substance désorbée, rapporté à la quantité de substance préalablement adsorbée, dans les conditions d'essai, soit:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

où:

$D_{t_i}$  = est le pourcentage de désorption à l'instant  $t_i$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = est la masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_s^{ads}(eq)$  = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ ).

L'appendice 5 donne des informations détaillées sur la manière de calculer le pourcentage de désorption  $D_i$ , par la méthode parallèle et séquentielle.

Le coefficient de désorption apparente ( $K_{des}$ ) correspond, dans les conditions d'essai, au rapport entre le contenu de la substance restant dans la phase du sol et la concentration massique de la substance désorbée dans la solution aqueuse, lorsque l'équilibre de désorption est atteint, soit:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{sol}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

où:

$K_{des}$  = est le coefficient de désorption ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ );

$m_{aq}^{des}(eq)$  = est la masse totale de substance désorbée à partir du sol à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = est le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption ( $\text{cm}^3$ ).

Le point «Désorption» de l'appendice 5 explique comment calculer  $m_{aq}^{des}(eq)$ .

Remarque:

Si l'essai d'adsorption a été réalisé avec la méthode parallèle, le volume  $V_T$  de l'équation 12 est estimé égal à  $V_0$ .

### 2.2.1. Isothermes de désorption

L'équation des isothermes de désorption de Freundlich relie la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à la concentration de substance en solution à l'équilibre de désorption (équation 16).

La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est calculé pour chaque tube de la manière suivante:

$$C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{soil}}} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  est défini comme:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_m^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_r^f} - m_{\text{aq}}^{\Lambda} (\mu\text{g}) \quad (14)$$

où:

$C_s^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$m_m^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\Lambda}$  = est la masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un remplacement volumique incomplet ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la masse de substance en solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ ):

$$m_{\text{aq}}^{\Lambda} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_r^f$  = est le volume de solution prélevé du tube afin de mesurer la substance, à l'équilibre de désorption ( $\text{cm}^3$ );

$V_R$  = est le volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par le même volume de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ ).

L'équation de la désorption de Freundlich s'écrit:

$$C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = K_F^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

ou, sous une forme linéaire:

$$\log C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

où:

$K_F^{\text{des}}$  = est le coefficient de désorption de Freundlich;

$n$  = est la constante de régression;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = est la concentration massique de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ).

Les équations 16 et 17 peuvent être portées sur un graphique et les valeurs  $K_F^{\text{des}}$  et  $1/n$  sont calculées au moyen d'une analyse de régression en utilisant l'équation 17.

Remarque:

Si l'exposant d'adsorption ou de désorption de Freundlich  $1/n$  est égal à 1, les constantes d'adsorption ou de désorption de Freundlich ( $K_F^{\text{ads}}$  et  $K_F^{\text{des}}$ ) sont identiques aux constantes d'adsorption ou de désorption à l'équilibre ( $K_d$  et  $K_{\text{des}}$ ) et les graphiques de  $C_s$  en fonction de  $C_{\text{aq}}$  seront linéaires. Si les exposants ne sont pas égaux à 1, les graphiques de  $C_s$  en fonction de  $C_{\text{aq}}$  seront non linéaires et les constantes d'adsorption et de désorption varieront selon les isothermes.



### 2.2.2 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal doit comprendre les informations suivantes :

- Identification complète des échantillons de sol utilisés, à savoir :
- références géographiques du site (latitude, longitude);
- date de l'échantillonnage;
- origine (sol agricole, forêt, etc.);
- profondeur de l'échantillonnage;
- contenu en sable/limon/argile;
- valeurs du pH (dans  $\text{CaCl}_2$  0,01M);
- teneur en carbone organique;
- teneur en matière organique;
- teneur en azote;
- rapport C/N;
- capacité d'échange cationique (mmol/kg);
- toutes les informations sur la collecte et le stockage des échantillons de sol;
- le cas échéant, toutes les informations utiles à l'interprétation de l'adsorption et de la désorption de la substance testée;
- la référence aux méthodes utilisées pour déterminer chaque paramètre;
- le cas échéant, des informations sur la substance à tester;
- la température des essais;
- les conditions de centrifugation;
- le procédé utilisé pour analyser la substance;
- les raisons motivant l'emploi d'un agent solubilisant pour préparer la solution de substance de réserve;
- les raisons expliquant les corrections de calcul, le cas échéant;
- les données relatives au formulaire (appendice 6) et à la présentation graphique;
- toutes les informations et observations utiles pour interpréter les résultats des essais.

### 3. Bibliographie

- (1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
- (2) Fränzle O., Kuhn G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
- (3) Kuhn G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils : Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
- (5) US-Environment Protection Agency : Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry : Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date : 1/1988.
- (6) US-Environment Protection Agency : Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No : 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No : 712-C-96-048, April 1996.
- (7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ( $K_{oc}$ ) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- (8) Agriculture Canada : Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- (9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995) : Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988) : Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- (11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- (12) Calvet R., (1989), « Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils », in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- (13) Calvet R., (1980) « Adsorption-Desorption Phenomena » in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
- (14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), « The sorption of nonpolar organics by soils and sediments » in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
- (15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), « An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media ». Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.
- (16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), « Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis », in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- (17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), « Movement and sorption of chemicals applied to the soil ». Weeds, 13, pp. 185-190.
- (18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) « Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils ». J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.
- (19) Russell M.H., (1995), « Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil » in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- (20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), « Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides », IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

- (21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), « Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils ». Proc. BCPC Symposium : Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
- (22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), « Persistence of herbicides in soil ». J. Sci. Fd Agric., pp. 18, 269-273.
- (23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), « Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption ». Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.
- (24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). « Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides ». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.
- (25) Osgerby J.M., (1973), « Process affecting herbicide action in soil ». Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.
- (26) Guth J.A., (1972), « Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden ». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.
- (27) Hamaker J.W., (1975), « The interpretation of soil leaching experiments », in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
- (28) Helling C.S., (1971), « Pesticide mobility in soils ». Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
- (29) Hamaker J.W., (1972), « Diffusion and volatilization » in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.
- (30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), « Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system ». Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.
- (31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), « Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses », in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (32) Gustafson D.I., (1989), « Groundwater ubiquity score : a simple method for assessing pesticide leachability ». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.
- (33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). « Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils ». J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.
- (34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), « Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils ». Pest. Sci., 11, pp. 389-395.
- (35) Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), « Sorption estimates for modeling », in Pesticides in the Soil Environment : Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.
- (36) Lambert S.M., (1967), « Functional relationship between sorption in soil and chemical structure ». J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.
- (37) Hance R.J., (1969), « An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils ». J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.
- (38) Briggs G.G. (1969), « Molecular structure of herbicides and their sorption by soils ». Nature, 223, 1288.
- (39) Briggs G.G. (1981). « Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor ». J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (40) Sabljic A., (1984), « Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology ». J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
- (41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), « Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil ». Residue Rev., 32, pp. 29-92.
- (42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), « Adsorption of organic herbicides by montomorillonite : Role of pH and chemical character of adsorbate ». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32, pp. 222-234.
- (43) Karickhoff S.W., (1981) « Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils ». Chemosphere 10, pp. 833-846.
- (44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), « Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners ». Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.
- (45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). « Adsorption in organic chemicals » in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
- (46) Deli J., and Warren G.F., 1971, « Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils ». Weed Sci. 19, pp. 67-69.
- (47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), « Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils ». Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.
- (48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) « Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations » in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
- (49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), « Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase », CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III : Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- (50) ISO Standard Compendium Environment : Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- (51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- (52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. « Methods of Soil Analysis », Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
- (53) ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1 : Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2 : Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3 : Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4 : Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5 : Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- (58) ISO 10381-6, 1993 : Soil Quality - Sampling - Part 6 : Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) « Precision in pesticide adsorption measurements ». Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.
- (60) Grover R., and Hance R.J. (1970), « Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine ». Soil Sci., pp. 109-138.

- (61) Boesten, J.J.T.I. « Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system ». *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31-41.
- (62) Boesten, J.J.T.I. « Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106 » Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.
- (63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), « Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique ». *Weed Res.* 21, pp. 227-231.
- (64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), « Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments ». *J. Environ.Qual.*, 10(3), pp. 382-386.
- (65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), « Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water ». *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), pp. 227-231.
- (66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), « Sorption of organic substances by soils and sediments ». *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 297-312.
- (67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), « Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons ». *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
- (68) Lyman W.J., Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds.* American Chemical Society, Washington DC.
- (69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). « Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota » in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
- (70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), « A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds ». *Science*, Vol. 206, pp. 831-832.
- (71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), « Sorption of *p*-Naphthol : implications concerning the limits of hydrophobic sorption ». *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, pp. 38-42.
- (72) Karickhoff S.W., (1981), « Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils ». *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833-846.
- (73) Moreale A., van Bladel R., (1981), « Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319-322.
- (74) Müller M., Kördel W. (1996), « Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil ». *Chemosphere*, 32 (12), pp. 2493-2504.
- (75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), « HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test ». *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
- (76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), « HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
- (77) Hance, R.J., (1967), « The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides ». *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
- (78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), « The retention processes : mechanisms » in *Pesticides in the Soil Environment : Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- (79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), « Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses », in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (80) Giles C.H., (1970), « Interpretation and use of sorption isotherms » in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.
- (81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), « Studies in adsorption : XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils ». *J. Chem. Soc.*, pp. 3973-93.
- (82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), « Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants : 3. Caractéristiques générales de l'adsorption ». *Ann. Agron.* 31, pp. 239-251.
- (83) Bedbur E., (1996), « Anomalies in the Freundlich equation », Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
- (84) Guth, J.A., (1985), « Adsorption/desorption », in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
- (85) Soil Texture Classification (US and FAO systems) : *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26 :305 (1962).

## Notes

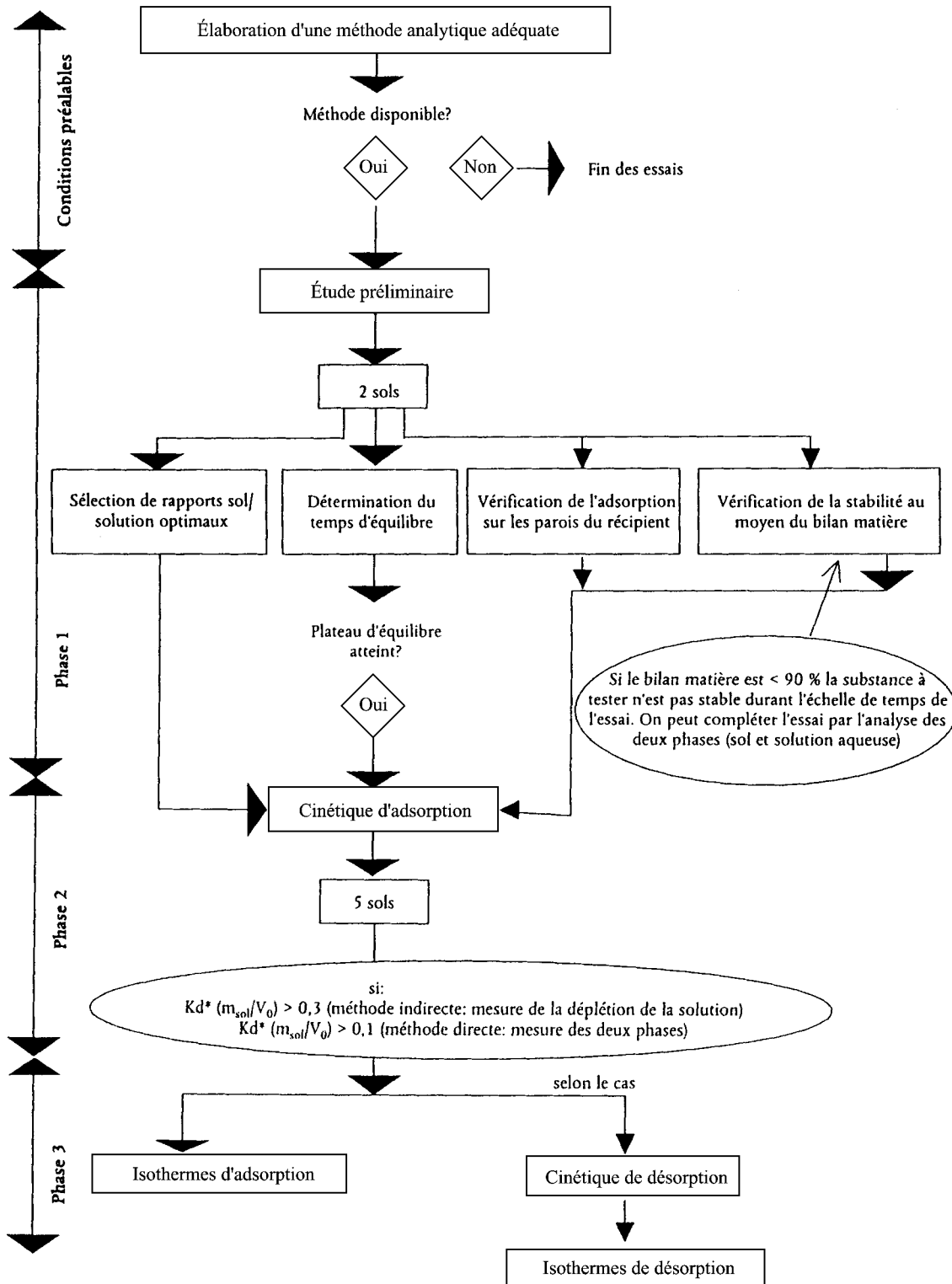
$${}^1 C_{s,ads}^{ds}(eq) = K_d \cdot C_{s,q}^{ds}(eq)$$

(<sup>2</sup>) On peut également utiliser des graphiques de concentration de la substance en phase aqueuse  $C_{aq}^{ads}$  en fonction du temps pour estimer l'obtention du plateau d'équilibre (voir la fig. 2 de l'appendice 5).

(<sup>3</sup>) DT — 50 : temps de dégradation de 50 % de la substance d'essai

APPENDICE 1

ORGANIGRAMME D'ESSAI



## APPENDICE 2

## LES EFFETS DE LA PRÉCISION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE ET DES VARIATIONS DE CONCENTRATION SUR LA PRÉCISION DES RÉSULTATS DE L'ADSORPTION

Il ressort clairement du tableau suivant (84) que si la différence entre la masse initiale ( $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ) et la masse ( $m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$ ) de la substance dans la solution à l'équilibre est très faible, une erreur de 5 % dans la mesure de la concentration à l'équilibre fausse de 50 % le calcul de la quantité de la substance adsorbée sur le sol ( $m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ ) et de 52,4 % le calcul de  $K_d$ .

Quantité de sol  $m_{\text{sol}} \approx 10 \text{ g}$   
 Volume de solution  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	R	$(m_s^{\text{ads}}(\text{eq}))^*$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$R^{\dagger}$	$K_d^*$	$R^{\dagger}$
<b>POUR A = 9 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ ou $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	100	1,000	valeur réelle	10	1,00	valeur réelle	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
<b>POUR A = 55 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ ou $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	50,0	0,500	valeur réelle	60,0	6,00	valeur réelle	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
<b>POUR A = 99 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ ou $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	1,100	0,011	valeur réelle	108,9	10,89	valeur réelle	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

où:

$$*m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{sol}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) V_0}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) m_{\text{sol}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la masse de substance dans la phase de sol à l'équilibre ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la masse de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre ( $\mu\text{g}$ );

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la concentration de substance dans la phase de sol à l'équilibre ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

R = est l'erreur analytique lors du calcul de  $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ;

$R^{\dagger}$  = est l'erreur calculée due à l'erreur analytique R.



## APPENDICE 3

TECHNIQUES D'ESTIMATION DE  $K_d$ 

1. Les techniques d'estimation permettent de prédire  $K_d$  en se fondant sur des corrélations avec des valeurs  $P_{ow}$  (12) (39) (63-68), avec des données sur l'hydrosolubilité (12) (19) (21) (39) (68-73) ou avec des données sur la polarité obtenues par HPLC en phase inversée (74-76). Comme le montrent les tableaux 1 et 2, on calcule  $K_{oc}$  ou  $K_{om}$  à partir de ces équations puis on obtient, indirectement,  $K_d$  à partir des équations suivantes:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Ces corrélations se fondent sur deux hypothèses: 1) c'est la matière organique du sol qui influence principalement l'adsorption d'une substance; 2) les interactions en jeu sont essentiellement non polaires. Il en résulte que ces corrélations: 1) ne sont pas applicables aux substances polaires, ou uniquement de manière limitée et: 2) qu'elles ne s'appliquent pas lorsque la teneur en matière organique du sol est très faible (12). Par ailleurs, si l'on a trouvé des corrélations satisfaisantes entre  $P_{ow}$  et l'adsorption (19), on ne peut pas en dire autant des relations entre l'hydrosolubilité et l'étendue de l'adsorption (19) (21); les études sont par conséquent très contradictoires.
3. Les tableaux 1 et 2 donnent quelques exemples de corrélations entre le coefficient d'adsorption et, respectivement, le coefficient de partage octanol-eau et l'hydrosolubilité.

**Tableau 1.** Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et le coefficient de partage octanol-eau; pour d'autres exemples voir (12) (68)

Substances	Corrélations	Auteurs
Urée substituée	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Substances aromatiques chlorées	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Divers pesticides	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Hydrocarbures aromatiques	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles et Mantoura (1987) (67)

**Tableau 2.** Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et l'hydrosolubilité; pour d'autres exemples voir (68) (69)

Composés	Corrélations	Auteurs
Divers pesticides	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Substances aliphatiques aromatiques chlorées	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
$\alpha$ -naphthol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Substances cycliques aliphatiques chlorées	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 \text{ (mp-25)}$	Karickhoff (1981) (72)
Divers composés	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

## APPENDICE 4

## CALCUL DES CONDITIONS DE CENTRIFUGATION

1. Le temps de centrifugation est donné par la formule suivante (on suppose que les particules sont sphériques):

$$t = \frac{9}{2} \left[ \frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Par commodité, tous les paramètres sont indiqués en unités n'appartenant pas au SI (g, cm)

où:

$\omega$  = vitesse de rotation (=2  $\pi$  rpm/60), rad s<sup>-1</sup>

rpm = tours par minute;

$\eta$  = viscosité de la solution, g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$r_p$  = rayon des particules, cm

$\rho_s$  = densité du sol, g cm<sup>-3</sup>

$\rho_{aq}$  = densité de la solution, g cm<sup>-3</sup>

$R_t$  = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et le haut de la solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

$R_b$  = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et la base du tube de la centrifugeuse, cm

$R_b - R_t$  = longueur du mélange sol/solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

Dans la pratique, le double du temps calculé est nécessaire pour obtenir une séparation complète.

2. On peut simplifier l'équation (1) si l'on considère que la viscosité ( $\eta$ ) et la densité ( $\rho_{aq}$ ) de la solution sont égales à la viscosité et à la densité de l'eau à 25 °C; dans ce cas,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$  g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> et  $\rho_{aq} = 1,0$  g cm<sup>-3</sup>.

Le temps de centrifugation est donné par l'équation 2:

$$t = \frac{3,7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. L'équation 2 montre l'importance des paramètres du temps (t) et de la vitesse (rpm) pour définir les conditions de centrifugation permettant de séparer des particules d'une taille définie (c'est-à-dire d'un rayon de 0,1  $\mu$ m dans notre cas): 1) la densité du sol et 2) la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse ( $R_b - R_t$ ), déterminent la distance qu'une particule de sol doit parcourir entre le haut de la solution et la base du tube; il apparaît que, pour un volume fixe, la longueur du mélange dans le tube dépend du carré du rayon du tube.
4. La figure 1 présente les différents temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) pour différentes densités du sol ( $\rho_s$ ) (figure 1a) et pour différentes longueurs du mélange dans les tubes de la centrifugeuse (figure 2a). La figure 1a montre nettement l'influence de la densité du sol. Pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 240 min pour une densité du sol de 1,2 g cm<sup>-3</sup>, alors qu'il n'est que de 50 min pour 2,0 g cm<sup>-3</sup>. La figure 1b montre d'une manière similaire que, pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 50 min pour un mélange de 10 cm de long et de seulement 7 min pour une longueur de 1 cm. Il convient cependant de trouver un compromis optimal entre un mode de centrifugation exigeant le moins de longueur possible et la séparation commode des phases après la centrifugation.

5. De plus, lorsque l'on définit les conditions expérimentales de la séparation sol/solution, il importe de considérer l'existence d'une troisième «pseudo-phase», les colloïdes. Ces particules, d'une taille inférieure à 0,2 µm, peuvent influencer de manière significative le mécanisme d'adsorption d'une substance dans une suspension de sol. Après la centrifugation, réalisée comme cela est décrit ci-dessus, les colloïdes restent dans la phase aqueuse et sont analysés en même temps que celle-ci. On perd donc les informations sur leur impact.

Si le laboratoire dispose d'équipements d'ultracentrifugation ou d'ultrafiltration, il peut étudier plus en détail l'adsorption/désorption d'une substance dans le sol et obtenir des informations sur l'adsorption de la substance sur les colloïdes. Il faut effectuer dans ce cas une ultracentrifugation à 60 000 rpm/min ou une ultrafiltration avec des filtres d'une porosité de 100 000 dalton pour séparer les trois phases, sol, colloïdes, solution. Le protocole d'essai doit être modifié en conséquence afin que les trois phases soient analysées.

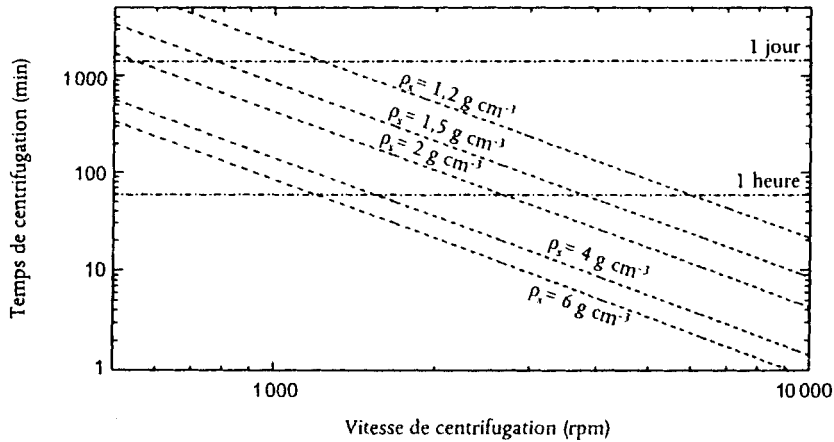


Fig. 1a. Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la densité du sol.  
 (ρ<sub>s</sub>). R<sub>1</sub> = 10 cm, R<sub>0</sub>-R<sub>1</sub> = 10 cm, η = 8,95 × 10<sup>-3</sup> g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> et ρ<sub>aq</sub> = 1,0 g cm<sup>-3</sup> à 25 °C.

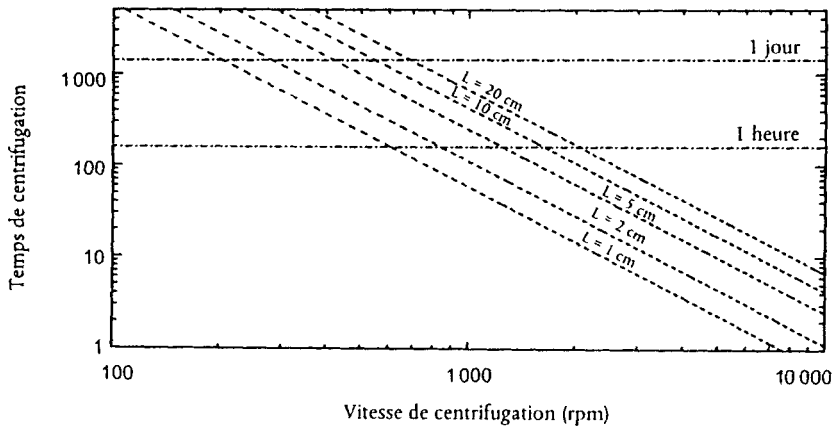
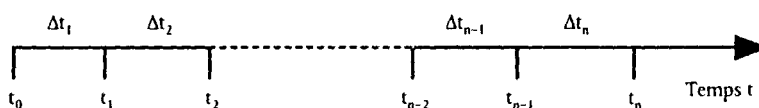


Fig. 1b. Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse (R<sub>0</sub>-R<sub>1</sub>) = L; R<sub>1</sub> = 10 cm, η = 8,95 × 10<sup>-3</sup> g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, ρ<sub>aq</sub> = 1,0 g cm<sup>-3</sup> à 25 °C et ρ<sub>s</sub> = 2,0 g cm<sup>-3</sup>.

## APPENDICE 5

## CALCUL DE L'ADSORPTION A (%) ET DE LA DÉSORPTION D (%)

Organisation de l'essai dans le temps:



On suppose pour tous les calculs que la substance d'essai est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur les parois du récipient.

## ADSORPTION A (A %)

a) *Méthode parallèle*

Le pourcentage d'adsorption est calculé pour chaque tube d'essai (i) au temps ( $t_i$ ) selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1) \quad (1)$$

On peut calculer ainsi les termes de l'équation:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

où:

$A_{t_i}$  = pourcentage d'adsorption (%) au temps  $t_i$

$m_s^{ads}(t_i)$  = masse de substance d'essai sur le sol au moment  $t_i$  où l'analyse est effectuée ( $\mu\text{g}$ )

$m_0$  = masse de la substance d'essai dans le tube au début de l'essai ( $\mu\text{g}$ )

$C_0$  = concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )

$C_{aq}^{ads}(t_i)$  = concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps  $t_i$  où l'analyse est effectuée ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ); cette concentration est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins

$V_0$  = volume initial de la solution en contact avec le sol ( $\text{cm}^3$ ).

Les valeurs du pourcentage d'adsorption  $A_{t_i}$  ou  $C_{aq}^{ads}(t_i)$  sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption (voir les figures 1 et 2).

(1) Équation applicable à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

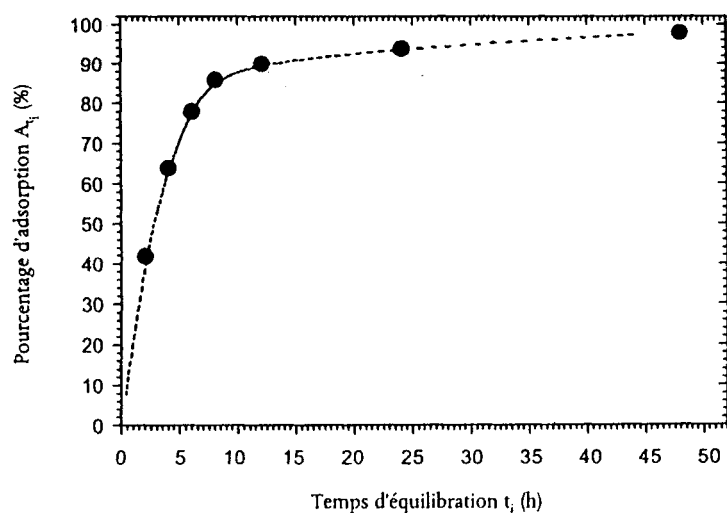


Figure 1. Courbe de l'équilibre d'adsorption

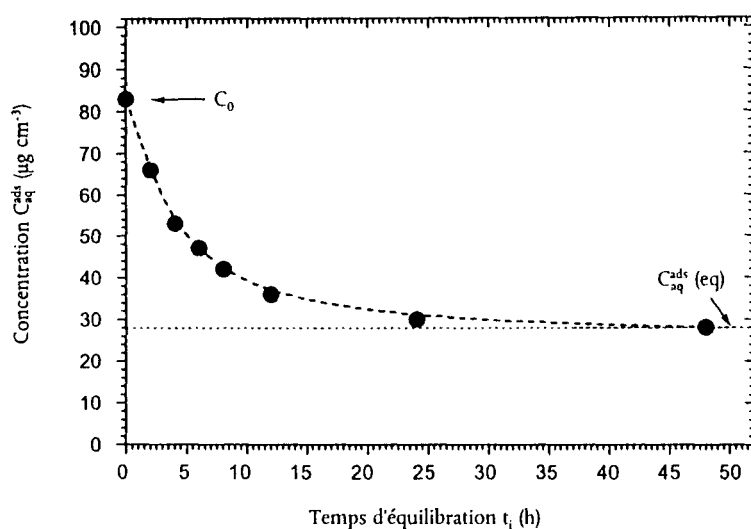


Figure 2. Concentration massique de la substance d'essai dans la phase aqueuse ( $C_{aq}$ ) en fonction du temps

b) Méthode séquentielle

Les équations suivantes tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption s'opère en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes de la phase aqueuse à des intervalles de temps précis.

— Durant chaque intervalle de temps, la quantité de substance adsorbée sur le sol est calculée comme suit:

— pour le premier intervalle de temps  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_2^\lambda}\right) \tag{4}$$

— pour le deuxième intervalle de temps  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_2^\lambda}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_2^\lambda}{v_2^\lambda}\right) \tag{5}$$



— pour le troisième intervalle de temps  $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_2^A}{v_2^A} \right) - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot v_2^A}{v_2^A} \right) \quad (6)$$

— pour le n<sup>ième</sup> intervalle de temps  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_2^A}{v_2^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-1) \cdot v_2^A}{v_2^A} \right) \quad (7)$$

— Le pourcentage d'adsorption à chaque intervalle de temps  $A_{\Delta t_i}$  est calculé selon l'équation suivante:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (8) \text{ (1)}$$

tandis que le pourcentage d'adsorption ( $A_t$ ) au temps  $t_i$  est donné par l'équation:

$$A_t = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (9) \text{ (1)}$$

Les valeurs de l'adsorption  $A_t$  ou  $A_{\Delta t_i}$  (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption.

— Au temps d'équilibre  $t_{eq}$ :

— la masse de substance adsorbée sur le sol est égale à:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10) \text{ (1)}$$

— la masse de substance dans la solution est égale à:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11) \text{ (1)}$$

— et le pourcentage d'adsorption à l'équilibre est égal à:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (12) \text{ (1)}$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$  = masse de substance adsorbée sur le sol durant les intervalles de temps  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$  = masse de substance mesurée dans une aliquote  $v_2^A$  au temps  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_s^{ads}(eq)$  = masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ )

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ )

$v_2^A$  = volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée ( $\text{cm}^3$ )

$A_{\Delta t_i}$  = pourcentage d'adsorption correspondant à l'intervalle de temps  $\Delta t_i$  (%)

$A_{eq}$  = pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

(1) Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

## DÉSORPTION D (%)

Le temps  $t_0$  qui marque le début de l'essai de cinétique de désorption correspond au moment où le volume maximal de substance récupérée (une fois que l'équilibre d'adsorption a été atteint) est remplacé par un volume égal de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M.

## a) Méthode parallèle

Au temps  $t_i$ , on mesure la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse prélevée dans le tube  $i$  ( $V_i^j$ ) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{V_i^j} \right) - m_{\text{aq}}^{\Lambda} \quad (13)$$

À l'équilibre de désorption  $t_i = t_{\text{eq}}$  de sorte que  $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ .

La masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps ( $\Delta t_i$ ) est donnée par l'équation suivante:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Le pourcentage de désorption est calculé comme suit:

— au temps  $t_i$  avec l'équation:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (15)$$

— durant l'intervalle de temps ( $\Delta t_i$ ) avec l'équation:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (16)$$

où:

$D_{t_i}$  = pourcentage de désorption au temps  $t_i$  (%)

$D_{\Delta t_i}$  = pourcentage de désorption à l'intervalle de temps  $\Delta t_i$  (%)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$  = masse de substance désorbée au temps  $t_i$ , ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$  = masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps  $\Delta t_i$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$  = masse de substance mesurée par analyse au temps  $t_i$  dans un volume de solution  $V_i^j$  prélevé pour l'analyse ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\Lambda}$  = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{\text{aq}}^{\Lambda} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

où:

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption ( $\mu\text{g}$ )

$V_R$  = volume de surnageant prélevé du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égal de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ )

$V_i^j$  = volume de solution prélevé du tube ( $i$ ) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption ( $\text{cm}^3$ ).

Les valeurs de désorption  $D_i$  ou  $D_{\Delta_i}$  (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on calcule le temps mis pour atteindre l'équilibre de désorption.

b) *Méthode séquentielle*

Les équations ci-après tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption a été réalisé en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes ( $v_a^A$ ) de la phase aqueuse (voir le chapitre sur la méthode séquentielle au point 1.9 «Réalisation de l'essai»). On suppose a) que le volume de surnageant prélevé du tube après l'essai de cinétique d'adsorption a été remplacé par un volume égal de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $V_R$ ) et b) que le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol ( $V_T$ ) durant l'essai de cinétique de désorption reste constant et égal à l'équation suivante:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

Au temps  $t_i$ :

— La masse de substance est mesurée dans une petite aliquote ( $v_a^D$ ) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— À l'équilibre de désorption  $t_i = t_{\text{eq}}$  de sorte que  $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ .

— Le pourcentage de désorption  $D_i$  est calculé selon l'équation suivante:

$$D_i = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (20)$$

À l'intervalle de temps ( $\Delta t_i$ ):

La quantité de substance désorbée durant chaque intervalle de temps est calculée de la manière suivante:

— pour le premier intervalle de temps  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_m^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{aq}}^A \quad \text{et} \quad m_s^{\text{des}}(t_1) = m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pour le deuxième intervalle de temps  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \quad \text{et}$$

$$m_s^{\text{des}}(t_2) = m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) - [m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

— pour le  $n^{\text{ième}}$  intervalle de temps  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[ m_m^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{aq}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right] \quad \text{et}$$

$$m_s^{\text{des}}(t_n) = m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Enfin, le pourcentage de désorption à chaque intervalle de temps  $D_{\Delta t_i}$  est calculé au moyen de l'équation suivante:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

tandis que le pourcentage de désorption  $D_{t_i}$  à un moment  $t_i$  est donné par l'équation ci-dessous:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masse de substance restant adsorbée sur le sol après les intervalles de temps  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masse de substance désorbée durant les intervalles de temps  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{m}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{m}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$  = masse de substance mesurée dans une aliquote  $v_{\text{s}}^{\text{D}}$  au temps  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ ):

$V_{\text{T}}$  = volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle ( $\text{cm}^3$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{A}}$  = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant ( $\mu\text{g}$ ):

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{s}}^{\text{A}}(i) \right) - V_{\text{R}}}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{s}}^{\text{A}}(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

où:

$V_{\text{R}}$  = volume de surnageant extrait du tube après l'obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égal de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ )

$v_{\text{s}}^{\text{D}}$  = volume d'aliquote extrait du tube (i) pour analyse durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle ( $\text{cm}^3$ ):

$$v_{\text{s}}^{\text{D}} \leq 0,02 \cdot V_{\text{T}} \quad (27)$$

## APPENDICE 6

## ADSORPTION-DÉSORPTION DANS LES SOLS: PRÉSENTATION DES DONNÉES (FORMULAIRES)

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

## Adéquation de la méthode analytique

Poids du sol	g	
Sol: matière sèche	g	
Volume de la solution de CaCl <sub>2</sub>	cm <sup>3</sup>	
Concentration nominale de la solution finale	µg cm <sup>-3</sup>	
Concentration d'analyse de la solution finale	µg cm <sup>-3</sup>	

Méthode analytique utilisée:

Calibration de la méthode analytique:



Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte  Parallèle  Séquentielle   
 Directe

**Essai d'adsorption: échantillons d'essai**

	Symbole	Unités	Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage	
Tube n°										
Poids du sol	—	g								
Sol: matière sèche	$m_{sol}$	g								
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	$V_{WS}$	cm <sup>3</sup>								
Volume de CaCl <sub>2</sub> 0,01 M pour équilibrer le sol		cm <sup>3</sup>								
Volume de solution de réserve		cm <sup>3</sup>								
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	$V_0$	cm <sup>3</sup>								
Concentration initiale de la solution à tester	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>								
Masse de substance au début de l'essai	$m_0$	µg								

**Après agitation et centrifugation**

**Méthode indirecte**

**Méthode parallèle**

Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoins incluse	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm <sup>-3</sup>								
---	---------------------	---------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

**Méthode séquentielle**

Masse de substance mesurée dans l'aliquote $V_2^A$	$m_{2q}^{ads}(t_i)$	µg								
--	---------------------	----	--	--	--	--	--	--	--	--

**Méthode directe**

Masse de substance adsorbée sur le sol	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
--	------------------	----	--	--	--	--	--	--	--	--

**Calcul de l'adsorption**

Adsorption	$A_{t_i}$	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Moyennes										
Coefficient d'adsorption	$K_d$	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>								
Moyennes										
Coefficient d'adsorption	$K_{oc}$	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>								
Moyennes										

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

**Essai d'adsorption: témoins et contrôles**

	Symbole	Unités	Témoin		Témoin		Contrôle	
Tube n°								
Poids du sol		g					0	0
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)		cm <sup>3</sup>					—	—
Volume de solution de CaCl <sub>2</sub> 0,01 M ajouté		cm <sup>3</sup>						
Volume ajouté de solution de réserve de la substance		cm <sup>3</sup>	0	0				
Volume total de la phase aqueuse (calculé)		cm <sup>3</sup>					—	—
Concentration initiale de la substance dans la phase aqueuse		µg cm <sup>-3</sup>						
<b>Après agitation et centrifugation</b>								
Concentration dans la phase aqueuse		µg cm <sup>-3</sup>						

Remarque: ajouter des colonnes si nécessaire.

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

**Bilan matière**

	Symbole	Unités				
Tube n°						
Poids du sol	—	g				
Sol: matière sèche	$m_{sol}$	g				
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	$V_{WS}$	ml				
Volume de CaCl <sub>2</sub> 0,01 M pour équilibrer le sol		ml				
Volume de solution de réserve		cm <sup>3</sup>				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	$V_0$	cm <sup>3</sup>				
Concentration initiale de la solution à tester	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>				
Temps d'équilibrage	—	h				

**Après agitation et centrifugation**

Concentration de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption, correction témoin incluse	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm <sup>-3</sup>				
Temps d'équilibrage	$t_{eq}$	h				

**1<sup>re</sup> dilution au solvant**

Volume extrait de phase aqueuse	$V_{rec}$	cm <sup>3</sup>				
Volume ajouté de solvant	$\Delta V$	cm <sup>3</sup>				

**1<sup>re</sup> extraction au solvant**

Signal analysé dans le solvant	$S_{E1}$	var.				
Concentration de substance dans le solvant	$C_{E1}$	µg cm <sup>-3</sup>				
Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient	$m_{E1}$	µg				

**2<sup>e</sup> dilution au solvant**

Volume de solvant extrait	$\Delta V_s$	cm <sup>3</sup>				
Volume de solvant ajouté	$\Delta V'$	cm <sup>3</sup>				

**2<sup>e</sup> extraction au solvant**

Signal analysé dans le solvant	$S_{E2}$	var.				
Concentration de substance dans le solvant	$C_{E2}$	µg cm <sup>-3</sup>				
Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient	$m_{E2}$	µg				
Masse totale de substance; extraction en deux étapes	$m_E$	µg				
Bilan matière	MB	%				

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

**Isothermes d'adsorption**

	Symbole	Unités							
Tube n°									
Poids du sol	—	g							
Sol: matière sèche	E	g							
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	$V_{ws}$	cm <sup>3</sup>							
Volume de CaCl <sub>2</sub> 0,01 M pour équilibrer le sol		cm <sup>3</sup>							
Volume de solution de réserve ajouté		cm <sup>3</sup>							
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol (calculé)	$V_0$	cm <sup>3</sup>							
Concentration de la solution	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>							
Temps d'équilibration	—	h							

**Après agitation et centrifugation**

Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoin incluse	$C_{aq}^{ads}$ (eq)	µg cm <sup>-3</sup>							
Température		°C							
Masse adsorbée par unité de sol	$C_s^{ads}$ (eq)	µg g <sup>-1</sup>							

Analyse de régression:

valeur de  $K_f^{ads}$ :

valeur de 1/n:

coefficient de régression  $r^2$ :

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte  Parallèle  Séquentielle

**Essai de désorption**

	Symbole	Unités	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps
Tube n° provenant de l'essai d'adsorption						
Masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	$m_1^{ads} (eq)$	µg				
Volume extrait de phase aqueuse remplacé par CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	$V_R$	cm <sup>3</sup>				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	PM SM	$V_0$ $V_T$	cm <sup>3</sup> cm <sup>3</sup>			
Masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant	$m_{aq}^A$	µg				

**Cinétique de désorption**

Masse mesurée de substance désorbée du sol au temps $t_i$		$m_m^{des} (t_i)$	µg			
Volume de solution extrait du tube (i) afin de mesurer la substance	PM	$V_r^i$	cm <sup>3</sup>			
	SM	$V_a^D$	cm <sup>3</sup>			
Masse de substance désorbée du sol au temps $t_i$ (calculé)		$m_{aq}^{des} (t_i)$	µg			
Masse de substance désorbée du sol durant l'intervalle de temps $\Delta t_i$ (calculé)		$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	µg			

**Pourcentage de désorption**

Désorption au temps $t_i$	$D_{t_i}$	%				
Désorption à l'intervalle de temps $\Delta t_i$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coefficient de désorption apparente	$K_{des}$					

PM: Méthode parallèle.

SM: Méthode séquentielle.

## C.19. ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION ( $K_{OC}$ ) SUR LE SOL ET LES BOUES D'EPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

### 1. METHODE

La méthode décrite reprend la ligne directrice n° 121 de l'OCDE (2000).

#### 1.1 INTRODUCTION

On peut décrire le comportement de sorption des substances dans les sols ou les boues d'épuration à l'aide de paramètres déterminés expérimentalement selon la méthode d'essai C18. Un des paramètres essentiels est le coefficient d'adsorption, défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans le sol ou les boues et sa concentration dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption. Le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique du sol ( $K_{oc}$ ) est un bon indicateur de la capacité de liaison d'une substance chimique à la matière organique du sol ou des boues d'épuration, et permet de comparer les substances chimiques entre elles. On peut estimer ce paramètre à partir de corrélations entre la solubilité dans l'eau et le coefficient de partage n-octanol/eau (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

La méthode expérimentale décrite dans cet essai utilise la HPLC pour estimer le coefficient d'adsorption  $K_{oc}$  dans le sol ou les boues d'épuration (8). Elle donne des résultats beaucoup plus fiables que ceux obtenus par les calculs de la méthode QSAR (9). En tant que méthode d'estimation, elle ne peut pas être totalement substituée aux essais par agitation conduits dans le cadre de la méthode d'essai C18. Toutefois, le  $K_{oc}$  estimé peut servir à sélectionner des paramètres d'essai pertinents pour l'étude des processus d'adsorption/désorption suivant la méthode précitée, grâce au calcul du coefficient de distribution ( $K_d$ ) ou du coefficient d'adsorption de Freundlich ( $K_f$ ) selon l'équation 3 (voir point 1.2).

#### 1.2 DEFINITIONS

$K_d$  est le coefficient de distribution défini comme le rapport des concentrations à l'équilibre (C) d'une substance d'essai dissoute dans un système à deux phases dont une sorbante (sol ou boues d'épuration) et l'autre aqueuse. Il est sans unité lorsque les concentrations dans les deux phases sont exprimées en termes de poids par poids. Si la concentration dans la phase aqueuse est exprimée en poids par volume, les unités sont alors en  $ml \cdot g^{-1}$ .  $K_d$  est susceptible de varier en fonction des propriétés du sorbant et peut dépendre de la concentration. On le calcule selon l'équation suivante :

$$K_d = \frac{C_{sol}}{C_{aq}} \text{ ou } \frac{C_{boues}}{C_{aq}} \quad (1)$$

où:

$C_{sol}$  = est la concentration de la substance d'essai dans le sol à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot g^{-1}$ )

$C_{boues}$  = est la concentration de la substance d'essai dans les boues à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot g^{-1}$ )

$C_{aq}$  = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot g^{-1}$ ,  $\mu g \cdot ml^{-1}$ ).

$K_f$  est le coefficient d'adsorption de Freundlich, défini comme la concentration de la substance d'essai dans le sol ou les boues d'épuration ( $x/m$ ) lorsque la concentration à l'équilibre ( $C_{aq}$ ) dans la phase aqueuse est égale à un. Il est exprimé en  $\mu g \cdot g^{-1}$  de sorbant. Sa valeur peut varier en fonction des propriétés du sorbant. Il se calcule selon l'équation suivante:

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

où:

$x/m$  = est la quantité de substance  $x$  ( $\mu g$ ) adsorbée sur la quantité de sorbant  $m$  ( $g$ ) à l'équilibre

$1/n$  = est la pente de l'isotherme d'adsorption de Freundlich

$C_{aq}$  = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption ( $\mu g \cdot ml^{-1}$ ).

Lorsque  $C_{aq} = 1$ ;  $\log K_f = \log \frac{x}{m}$



$K_{oc}$  est le coefficient de distribution ( $K_d$ ) ou le coefficient d'adsorption de Freundlich ( $K_f$ ) normalisé basé sur la teneur en carbone organique ( $f_{oc}$ ) du sorbant. Plus particulièrement dans le cas des substances non ionisées, il donne une approximation du degré d'adsorption d'une substance sur le sorbant et permet de faire des comparaisons entre différents produits chimiques. Dépendant de  $K_d$  et de  $K_f$ , il peut être sans unité ou s'exprimer en  $ml \cdot g^{-1}$  ou en  $\mu g \cdot g^{-1}$  de matière organique.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (sans unité ou en } ml \cdot g^{-1} \text{)} \text{ ou } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu g \cdot g^{-1} \text{)} \quad (3)$$

Comme la relation entre  $K_{oc}$  et  $K_d$  n'est pas toujours linéaire, les valeurs de  $K_{oc}$  peuvent donc varier d'un sol à l'autre, mais leur variabilité est très réduite par rapport aux valeurs de  $K_d$  ou de  $K_f$ .

Le coefficient d'adsorption ( $K_{oc}$ ) se déduit du facteur de capacité ( $k'$ ) à partir de la courbe d'étalonnage de  $\log k'$  en fonction de  $\log K_{oc}$ , tracée pour les composés de référence sélectionnés. L'équation est la suivante:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

où:

$t_R$  = est le temps de rétention de la substance d'essai et de la substance de référence dans la colonne de HPLC (en minutes)

$t_0$  = est le temps mort dans la colonne de HPLC (en minutes) (voir point 1.8.2).

$P_{ow}$ : est le coefficient de partage octanol/eau, défini comme le rapport des concentrations d'une substance dissoute dans l'eau et le n-octanol. Il est sans dimension.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

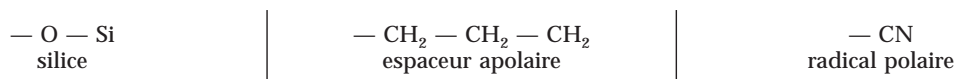
### 1.3 SUBSTANCES DE REFERENCE

Avant d'utiliser cette méthode, il convient de connaître la formule développée, la pureté et, le cas échéant, la constante de dissociation des substances de référence. Il est également utile d'être renseigné sur leur solubilité dans l'eau et les solvants organiques, leur coefficient de partage octanol/eau ainsi que sur leurs caractéristiques d'hydrolyse.

Pour établir la corrélation entre les résultats expérimentaux de rétention en HPLC d'une substance d'essai et son coefficient d'adsorption  $K_{oc}$ , on doit tracer la courbe d'étalonnage de  $\log K_{oc}$  en fonction de  $\log k'$ . Il faudrait utiliser au minimum six points dont au moins un supérieur et un inférieur à la valeur supposée de la substance d'essai. La précision de la méthode sera d'autant plus grande que les substances de référence employées présenteront une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai. S'il n'est pas possible d'avoir ces données, l'utilisateur est libre de sélectionner les substances d'étalonnage les mieux adaptées. Il devrait alors opter pour une série plus générale de substances présentant une hétérogénéité de structure. Les substances et les valeurs de  $K_{oc}$  recommandées à l'usage sont indiquées en annexe, au tableau 1 pour les boues d'épuration et au tableau 3 pour les sols. Il y aura donc lieu de justifier le choix de toute autre substance d'étalonnage.

### 1.4 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La HPLC est réalisée sur des colonnes d'analyse dont la phase solide est composée de résines commerciales cyanopropyliques contenant des radicaux lipophiles et polaires. On utilise une phase stationnaire modérément polaire basée sur une matrice de silice :



Le principe de cette méthode d'essai est analogue à celui de la méthode d'essai A.8 (coefficient de partage, méthode par HPLC). La substance d'essai, en migrant dans la colonne contenant la phase mobile, interagit avec la phase stationnaire. La répartition de la substance entre la phase mobile et la phase stationnaire contribue à en ralentir la progression. La composition de la phase stationnaire qui comporte à la fois des sites polaires et apolaires fait qu'une interaction est possible entre groupements polaires et radicaux apolaires d'une molécule - à l'instar de la matière organique dans des matrices de sol ou de boues d'épuration. On peut ainsi établir une relation entre le temps de rétention sur la colonne et le coefficient d'adsorption sur la matière organique.

Le pH exerce une influence significative, en particulier, sur le comportement de sorption des substances polaires. En règle générale, le pH varie entre 5,5 et 7,5 dans les sols agricoles et les bassins des stations de traitement des eaux usées. Les substances ionisables devraient être testées deux fois dans des solutions tampons appropriées, à savoir sous leur forme ionisée et non-ionisée, mais seulement si la dissociation du composé chimique atteint au moins 10 %, à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5.

Comme l'évaluation se fonde exclusivement sur la relation entre la rétention sur la colonne de HPLC et le coefficient d'adsorption, il est inutile de faire appel à une méthode d'analyse quantitative, car seule la détermination du temps de rétention est nécessaire. A condition de disposer d'une série de substances de référence appropriées et d'appliquer des conditions expérimentales normalisées, cette méthode constitue un moyen rapide et efficace d'estimer le coefficient d'adsorption  $K_{oc}$ .

### 1.5 APPLICABILITE DE L'ESSAI

La méthode par HPLC convient aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe un système de détection approprié (spectrophotomètre ou détecteur de radioactivité, par exemple) et qui restent suffisamment stables tout au long de l'essai. Elle peut s'avérer particulièrement utile pour les substances difficiles à étudier dans d'autres systèmes expérimentaux (à savoir, les substances volatiles, les substances insolubles dans l'eau à une concentration mesurable par analyse et les substances présentant une très grande affinité avec la surface des récipients d'incubation). On peut également l'appliquer à des mélanges qui donnent des bandes d'éluion non résolues. Dans ce cas, il faut déterminer les valeurs limites supérieures et inférieures du  $\log K_{oc}$  des composants du mélange d'essai.

Les impuretés risquent parfois de compliquer l'interprétation des résultats de la HPLC, mais leur importance restera négligeable si la substance d'essai peut être clairement identifiée et séparée des impuretés par une méthode analytique.

Après avoir été validée pour les substances énumérées au tableau 1 de l'appendice, cette méthode a été appliquée à toute une série d'autres composés chimiques répertoriés dans les classes chimiques suivantes :

- amines aromatiques (exemples : trifluraline, 4-chloroaniline, 3,5-dinitro-aniline, 4-méthylaniline, N-méthylaniline, 1-naphthylamine);
- esters d'acides carboxyliques aromatiques (exemples : ester méthylique de l'acide benzoïque, 3,5-dinitrobenzoate d'éthyle);
- hydrocarbures aromatiques (exemples : toluène, xylène, éthylbenzène, nitrobenzène);
- esters de l'acide aryloxyphénoxypropionique (exemples : diclofop-méthyle, fénoxaprop-éthyle, fénoxaprop-P-éthyle);
- fongicides à base de benzimidazole ou d'imidazole (exemples : carbendazime, fubéridazole, triazoxyde);
- amides de l'acide carboxylique (exemples : 2-chlorobenzamide, N,N-diméthylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-méthylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide);
- hydrocarbures chlorés (exemples : endosulfan, DDT, hexachlorobenzène, quitozène, 1,2,3-trichlorobenzène);
- insecticides organo-phosphorés (exemples : azinphos-méthyle, disulfoton, phénamiphos, isophenphos, pyrazophos, sulprophos, triazophos);
- phénols (exemples : phénol, 2-nitrophénol, 4-nitrophénol, pentachlorophénol, trichloro-2,4,6-phénol, 1-naphtol);
- dérivés de la phénylurée (exemples : isotroturon, monolinuron, pencycuron);
- colorants pigmentaires (exemples : Acid yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- hydrocarbures aromatiques polycycliques (exemples : acénaphthène, naphthalène);
- herbicides à base de triazine-1,3,5 (exemples : prométryne, propazine, simazine, terbutryne);
- dérivés de triazole (exemples : tébuconazole, triadiméfon, tradiméfon, triapenthénol).

Cette méthode ne convient pas aux substances réagissant avec l'éluant ou la phase stationnaire. Par ailleurs, elle n'est pas applicable aux substances qui interagissent de manière spécifique avec des constituants inorganiques (formation de complexes en grappe avec les minéraux argileux, par exemple). Elle risque d'être inopérante pour les produits tensio-actifs, les substances inorganiques ainsi que les acides et bases modérés à forts. Elle permet de déterminer des valeurs de  $\log K_{oc}$  comprises entre 1,5 et 5,0. Les substances ionisantes doivent être mesurées dans une phase mobile tamponnée, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la précipitation des composants du tampon ou de la substance d'essai.

### 1.6 CRITERES DE QUALITE

#### 1.6.1 Précision

En règle générale, le coefficient d'adsorption d'une substance d'essai peut être estimé à  $\pm 0,5$  unités logarithmiques de la valeur déterminée d'après la méthode par agitation (voir au tableau 1 de l'appendice). Il est possible d'atteindre une plus grande précision si les substances de référence utilisées présentent une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai.

#### 1.6.2 Répétabilité

Toutes les analyses doivent être répétées au moins deux fois. Les valeurs du  $\log K_{oc}$  calculées à partir de résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unités log.

#### 1.6.3 Reproductibilité

L'expérience acquise jusqu'à présent en appliquant la méthode d'essai par HPLC vient en corroborer la validité. A l'issue d'une étude expérimentant 48 substances (en majorité des pesticides) pour lesquelles existaient des données fiables concernant le  $K_{oc}$  sur des sols, on a obtenu un coefficient de corrélation :  $R = 0,95$  (10) (11).

Un essai comparatif inter-laboratoires conduit par 11 laboratoires a permis d'améliorer et de valider la méthode (12). Tous les résultats sont reproduits au tableau 2 de l'appendice.

### 1.7 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

#### 1.7.1 Estimation préliminaire du coefficient d'adsorption

Le coefficient de partage octanol/eau  $P_{ow}$  ( $= K_{ow}$ ) et, dans une certaine mesure, l'hydrosolubilité peuvent servir d'indicateurs du degré d'adsorption, en particulier, pour les substances non-ionisées. Ils permettent donc une première approximation des ordres de grandeur. Une série de corrélations utiles ont été publiées concernant plusieurs classes de produits chimiques (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

#### 1.7.2 Appareillage

L'appareillage doit nécessairement comprendre un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe sans pulsations et d'un système de détection adapté. Il est recommandé d'utiliser une boucle d'injection munie d'une valve d'injection. Il faut employer des résines commerciales cyanopropyliques liées chimiquement sur une base de silice (Hypersil ou Zorbax CN, par exemple). Une colonne de garde du même matériau peut être insérée entre le système d'injection et la colonne d'analyse. La puissance de séparation des colonnes d'analyse est susceptible de varier énormément d'un fournisseur à l'autre. A titre indicatif, il faudrait atteindre les facteurs de capacité ( $k'$ ) suivants :  $\log k' > 0,0$  pour  $\log K_{oc} = 3,0$  et  $\log k' > 0,4$  pour  $\log K_{oc} = 2,0$ , en utilisant une phase mobile méthanol/eau 55/45 %.

#### 1.7.3 Phases mobiles

Après avoir testé différentes phases mobiles, on recommande les deux suivantes :

- méthanol/eau (55/45 % v/v),
- méthanol/solution tampon de citrate 0,01M à pH 6,0 (55/45 % v/v).

Le solvant d'éluion est préparé à partir de méthanol de qualité HPLC et d'eau distillée ou d'un tampon citrate. Le mélange est dégazé avant emploi. Il est préférable d'effectuer une éluion isocratique. Si les mélanges méthanol/eau sont contre-indiqués, on peut essayer d'autres mélanges de solvant organique/eau, à savoir éthanol/eau ou acétonitrile/eau. Dans le cas de composés ionisants, il est recommandé d'utiliser une solution tampon afin de stabiliser le pH. Il faut veiller à éviter que les sels ne précipitent ou que la colonne ne se détériore, ce qui risque de se produire avec certains mélanges de phase organique/tampon.

On s'abstiendra d'utiliser des additifs tels que des réactifs à paires d'ions, car ils risquent d'affecter les propriétés sorbantes de la phase stationnaire. Vu que des modifications de cette nature dans la phase stationnaire risquent d'être irréversibles, il est impératif d'effectuer les analyses comportant ce type d'additifs sur des colonnes séparées.

#### 1.7.4 Solutés

Les substances de référence et d'essai doivent être dissoutes dans la phase mobile.

### 1.8 REALISATION DE L'ESSAI

#### 1.8.1 Conditions expérimentales

On doit enregistrer la température pendant les mesures. Il est fortement recommandé d'utiliser une colonne placée dans une enceinte thermostatée, afin de garantir des conditions de température constantes pendant les différents cycles d'étalonnage et d'évaluation et la mesure de la substance d'essai.

#### 1.8.2 Détermination du temps mort $t_0$

On peut utiliser deux méthodes pour déterminer le temps mort  $t_0$  (voir également au point 1.2).

##### 1.8.2.1 Détermination du temps mort $t_0$ au moyen d'une série homologue

Cette procédure a montré qu'il est possible d'obtenir des valeurs de  $t_0$  harmonisées et fiables. Pour sa description, il faut se reporter à la Méthode d'Essai A.8 « Coefficient de partage n-octanol/eau et méthode d'analyse par HPLC ».

##### 1.8.2.2 Détermination du temps mort $t_0$ par des substances inertes non retenues sur la colonne

Cette technique met en jeu l'injection de solutions de formamide, d'urée ou de nitrate de sodium. Il convient de répéter les mesures au moins deux fois.

#### 1.8.3 Détermination des temps de rétention $t_R$

Les substances de référence doivent être sélectionnées selon les indications du point 1.3. Pour déterminer leur temps de rétention, on peut les injecter sous la forme d'un étalon composite, à condition d'avoir vérifié au préalable que le temps de rétention de chaque étalon n'est pas influencé par la présence des autres étalons de référence. Il faudrait procéder à un étalonnage à intervalles réguliers, au moins deux fois par jour, pour tenir compte de toute variation imprévue dans le fonctionnement de la colonne. Pour la bonne règle, il est préférable d'injecter les étalons avant et après la substance d'essai pour s'assurer que les temps de rétention n'ont pas évolué. On injecte chaque substance d'essai séparément dans des proportions aussi faibles que possible (ce qui évite de surcharger la colonne), puis on détermine son temps de rétention.

Afin d'accroître la fiabilité des mesures, toutes les déterminations doivent être effectuées au moins en double. Les valeurs de  $\log K_{oc}$  déduites des résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unités  $\log$ .

#### 1.8.4 Evaluation

Les facteurs de capacité  $k'$  sont calculés à partir du temps mort  $t_0$  et des temps de rétention  $t_R$  des substances de référence selon l'équation 4 (voir au point 1.2). Les valeurs de  $\log k'$  des substances de référence sont ensuite portées sur une courbe graphique en fonction des valeurs de leur  $\log K_{oc}$  extraites des essais par agitation dont les résultats figurent aux tableaux 1 et 3 de l'appendice. A l'aide de cette courbe, la valeur du  $\log K_{oc}$  d'une substance d'essai est calculée à partir de son  $\log k'$ . Si les résultats expérimentaux montrent que le  $\log K_{oc}$  de la substance sort de l'intervalle des valeurs d'étalonnage, il convient de recommencer l'essai en employant d'autres substances de référence plus appropriées.

## 2. PRESENTATION DES DONNEES

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

- identité, degré de pureté et, le cas échéant, valeurs de  $pK_a$  des substances d'essai et de référence;
- description des matériels utilisés et des conditions expérimentales, en indiquant le type et les dimensions de la colonne d'analyse (et de la colonne de garde), du dispositif de détection, de la phase mobile (rapport des composants et pH), de la plage des températures pendant les mesures;
- temps mort et méthode appliquée pour l'évaluer;
- quantités de substances de référence et d'essai injectées dans la colonne;
- temps de rétention des composés de référence employés pour l'étalonnage;
- détails de la courbe de régression ajustée ( $\log k'$  en fonction de  $\log K_{oc}$ ) et représentation graphique de cette courbe;
- valeurs moyennes de rétention et valeur estimée du  $\log K_{oc}$  de la substance d'essai;
- chromatogrammes.

## 3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils : Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30 (7), pp. 1373-1384.

## APPENDICE

TABLEAU 1

Comparaison entre les valeurs de  $K_{oc}$  sur les sols et les boues d'épuration et les valeurs calculées suivant la méthode de sélection par HPLC <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>

Type de substance	N° CAS	Log $K_{oc}$ pour boues d'épuration	Log $K_{oc}$ par HPLC	$\Delta$	Log $K_{oc}$ pour sols	Log $K_{oc}$ par HPLC	$\Delta$
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phénanthrène	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoate de phényle	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acétanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

<sup>(1)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35 (1/2), pp. 121-128.

<sup>(2)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption coefficients of organic substances on sewage sludges. *Chemosphere*, 35 (1/2), pp. 107-119.

TABLEAU 2

Résultats des essais comparatifs inter-laboratoires (11 laboratoires participants) en vue d'améliorer et de valider la méthode par HPLC <sup>(1)</sup>

Type de substance	N° CAS	Log $K_{oc}$ (OCDE 106)	$K_{oc}$	Log $K_{oc}$
			[Méthode par HPLC]	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthénol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

<sup>(1)</sup> W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30 (7), pp. 1373-1384.

TABLEAU 3  
Substances de référence recommandées pour des essais de sélection par HPLC d'après des données relatives à l'adsorption sur les sols

Substance de référence	N° CAS	Valeurs moyennes de log $K_{oc}$ d'après la méthode par agitation	Nombre de résultats pour le $K_{oc}$	Écart type du log	Source
Acétanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	( <sup>a</sup> )
Phénol	108-95-2	1,32	4	0,70	( <sup>a</sup> )
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	( <sup>b</sup> )
N.N-diméthylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	( <sup>a</sup> )
4-Méthylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	( <sup>a</sup> )
Benzoate de méthyle	93-58-3	1,80	4	1,08	( <sup>a</sup> )
Atrazine	1912-24-9	1,81	3	1,08	( <sup>c</sup> )
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	( <sup>c</sup> )
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1,95	3	1,31	( <sup>b</sup> )
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	( <sup>a</sup> )
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	( <sup>b</sup> )
Carbendazime	10605-21-7	2,35	3	1,37	( <sup>c</sup> )
Triadiménol	55219-65-3	2,40	3	1,85	( <sup>c</sup> )
Triazoxyde	72459-58-6	2,44	3	1,66	( <sup>c</sup> )
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	( <sup>c</sup> )
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	( <sup>c</sup> )
Naphthalène	91-20-3	2,75	4	2,20	( <sup>a</sup> )
Endosulfane-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	( <sup>c</sup> )
Méthiocarbe	2032-65-7	3,10	4	2,39	( <sup>c</sup> )
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	( <sup>a</sup> )
1,2,3-Trichlorobenzène	87-61-6	3,16	4	1,40	( <sup>a</sup> )
$\gamma$ -HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	( <sup>a</sup> )
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	( <sup>c</sup> )
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	( <sup>a</sup> )
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	( <sup>c</sup> )
$\alpha$ -Endosulfane	959-98-8	4,09	5	3,74	( <sup>c</sup> )
Diclofop-méthyle	51338-27-3	4,20	3	3,77	( <sup>c</sup> )
Phénanthrène	85-01-8	4,09	4	3,83	( <sup>a</sup> )
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5	4,89	4	4,46	( <sup>a</sup> )
	12270-13-2				
DDT	50-29-3	5,63	1	—	( <sup>b</sup> )

(<sup>a</sup>) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).

(<sup>b</sup>) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(<sup>c</sup>) Données communiquées par les industriels.



## C.20 DAPHNIA MAGNA, ESSAI DE REPRODUCTION

### 1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de reproduction reprend la ligne directrice n° 211 de l'OCDE (1998).

#### 1.1 INTRODUCTION

Le principal objectif de l'essai consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur la capacité reproductrice de *Daphnia magna*.

#### 1.2 DEFINITIONS ET UNITES

Animaux parents : *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai et dont la capacité reproductrice représente l'objet de cette étude.

Descendants : jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

Concentration minimale avec effet observé (CME0) : concentration d'essai la plus basse à laquelle on a observé un effet statistiquement significatif de la substance sur la reproduction et la mortalité des animaux parents (à  $p < 0,05$ ) par rapport au témoin, durant une période d'exposition définie. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CME0 doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CME0. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CME0 (et donc de la CSEO).

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CME0 qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à  $p < 0,05$ ), durant une période d'exposition définie.

$CE_x$  : concentration de la substance d'essai dissoute dans l'eau qui entraîne une diminution de  $x$  % de la reproduction chez *Daphnia magna*, durant une période d'exposition définie.

Taux intrinsèque d'accroissement : mesure de l'accroissement de la population qui intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge (20) (21) (22). Cette valeur est nulle dans les populations à l'état stationnaire, positive dans les populations en croissance et négative dans les populations qui régressent. Cette dernière catégorie de population n'est évidemment pas durable et est vouée en fin de compte à l'extinction.

Limite de détection : la plus basse concentration susceptible d'être détectée, mais non chiffrée.

Limite de détermination : la plus basse concentration susceptible d'être mesurée quantitativement.

Mortalité : un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans les 15 secondes qui suivent l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, celle-ci doit être stipulée avec sa référence).

#### 1.3 PRINCIPE DE LA METHODE

De jeunes femelles de *Daphnia* (les animaux parents), âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai ajoutée à l'eau à différentes concentrations. L'essai dure 21 jours. A la fin de l'essai, le nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai est évalué. La capacité reproductrice des animaux parents peut s'exprimer autrement (par exemple, par le nombre de descendants vivants produits par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés), mais ces résultats doivent être fournis en plus du nombre total de juvéniles engendrés par parent survivant à la fin de l'essai. La capacité reproductrice des animaux exposés à la substance d'essai est comparée à celle des témoins, afin de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CME0) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). De plus, dans toute la mesure du possible, les résultats sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, en vue d'estimer la concentration qui entraînerait une réduction de  $x$  % de la capacité reproductrice, c'est-à-dire la  $CE_x$  (par exemple,  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  ou  $CE_{10}$ ).

Il faut aussi indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première portée. D'autres effets liés à la substance sur des paramètres tels que la croissance (par exemple, la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés.

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

Les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir Méthode C.2, partie I) réalisé sur *Daphnia magna* devraient être disponibles. Ces résultats peuvent être utiles pour sélectionner une plage de concentrations d'essai adaptée aux essais de reproduction. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Il faudrait pouvoir disposer d'une méthode d'analyse fiable, dont le rendement et la limite de détermination sont connus, pour doser la substance dans les solutions d'essai.

Des informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le  $pK_a$ , le coefficient de partage n-octanol/eau ( $P_{oe}$ ) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

#### 1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valable, les témoins doivent remplir les critères de performance suivants :

- la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai;
- le nombre moyen de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai est  $\geq 60$ .

#### 1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

##### 1.6.1 Appareillage

Les récipients d'essai et les autres dispositifs qui entreront en contact avec les solutions d'essai doivent être entièrement en verre ou constitués d'une autre matière chimiquement inerte. On utilisera en principe des béciers en verre.

En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant :

- un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume);
- un thermostat adéquat;
- un pH-mètre;
- un appareil pour mesurer la dureté de l'eau;
- un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO);
- un dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.



### 1.6.2 Organisme d'essai

L'espèce à utiliser dans cet essai est *Daphnia magna* Straus. D'autres espèces de *Daphnia* peuvent être utilisées à condition qu'elles remplissent les critères de validité pertinents (ceux qui concernent la capacité reproductrice des témoins doivent s'appliquer aux espèces de *Daphnia*). Si d'autres espèces de *Daphnia* sont utilisées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier leur utilisation.

Le clone devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. La recherche (1) a montré que la capacité reproductrice du clone A (originaire de l'IRCHA, en France) (3) répond de façon stable au critère de validité qui stipule une moyenne de  $\geq 60$  descendants par animal parent survivant, lorsqu'il est élevé dans les conditions décrites dans la présente méthode. D'autres clones sont toutefois acceptables à condition de prouver que la culture de *Daphnia* remplit les critères de validité pour l'essai.

Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de moins de 24 heures et ne peuvent pas provenir d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les *Daphnia*, il convient de laisser aux *Daphnia* une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure habituellement quelque trois semaines (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

### 1.6.3 Milieu d'essai

Il est recommandé d'utiliser un milieu entièrement défini dans cet essai. Cela permet d'éviter le recours aux additifs (par exemple, algues, extraits de sol, etc.), qui sont difficiles à caractériser, et d'améliorer ainsi les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elendt M4 (4) et M7 (voir appendice 1) se sont avérés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables (par exemple (5) et (6)), à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci devraient être spécifiés clairement et le rapport d'essai devrait comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est souhaitable que les concentrations de COT du milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) soient inférieures à 2 mg/l (7).

Lorsque l'on teste des substances contenant des métaux, il est important de savoir que les propriétés du milieu d'essai (par exemple, la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent influencer sur leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *Daphnia magna* sont Elendt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélateur EDTA. Des travaux ont montré (2) que la "toxicité apparente" du cadmium est généralement inférieure lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7, que dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour tester des substances contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélateurs connus. Il est souhaitable d'utiliser un autre milieu pour les substances renfermant des métaux, par exemple l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (7), qui ne contient pas d'EDTA, additionnée d'un extrait d'algues (8). La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues convient également aux essais et aux cultures à long terme de *Daphnia magna* (2), bien qu'elle exerce encore une légère action chélatante à cause des matières organiques contenues dans l'extrait d'algues.

Au début de l'essai et durant celui-ci, la concentration d'oxygène dissous devrait être supérieure à 3 mg/l. Le pH devrait être compris entre 6 et 9, et ne devrait normalement pas varier de plus de 1,5 unités au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (en  $\text{CaCO}_3$ ) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est avérée conforme aux critères de validité (9) (10).

### 1.6.4 Solutions d'essai

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Les solutions mères devraient, de préférence, être préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

Le recours à des dispersants ou solvants organiques peut quelquefois s'avérer nécessaire pour obtenir une solution mère à la concentration voulue, mais ces additifs doivent être évités dans toute la mesure du possible. Voici quelques exemples de solvants adéquats : acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Parmi les dispersants recommandables, citons le Cremophor RH40, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. En tout état de cause, la substance d'essai ne doit pas être testée au-delà de sa limite de solubilité dans le milieu d'essai.

Les solvants sont employés pour confectionner une solution mère qui peut être dosée avec précision dans l'eau. Les solvants énumérés ci-dessus, utilisés à la concentration recommandée dans le milieu d'essai final ( $\leq 0,1$  ml/l), ne seront pas toxiques et n'augmenteront pas la solubilité de la substance dans l'eau.

Les dispersants peuvent faciliter le dosage précis et la dispersion. À la concentration recommandée dans le milieu d'essai final ( $\leq 0,1$  ml/l), les dispersants mentionnés ci-dessus ne seront pas toxiques et n'augmenteront pas la solubilité de la substance dans l'eau.

## 1.7 CONCEPTION DE L'ESSAI

Les traitements sont répartis dans les récipients d'essai, et toutes les manipulations ultérieures de ces récipients sont réalisées dans un ordre aléatoire, faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures. En outre, si les résultats de l'essai sont susceptibles d'être affectés par une condition initiale ou liée à l'environnement, comme la situation dans le laboratoire, il conviendra d'envisager un plan en blocs.

## 1.8 MODE OPERATOIRE

### 1.8.1 Conditions d'exposition

#### 1.8.1.1 Durée

L'essai dure 21 jours.

#### 1.8.1.2 Charge

Les animaux parents sont répartis individuellement dans les récipients d'essai contenant chacun 50-100 ml de milieu.

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus importants, afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration de la substance d'essai, bien qu'il soit aussi possible de mélanger les récipients de même concentration aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 ml sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux Daphnia, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits. S'agissant des essais dynamiques, d'autres protocoles peuvent être envisagés pour des raisons techniques (par exemple, quatre groupes de 10 animaux dans des volumes expérimentaux plus élevés), mais toute modification du mode opératoire doit être signalée.

#### 1.8.1.3 Nombre d'animaux

Pour les essais semi-statiques, on utilisera au moins 10 animaux répartis individuellement à chaque concentration d'essai et au moins 10 animaux répartis individuellement dans la série de témoins.

Pour les essais dynamiques, il s'avère approprié d'utiliser 40 animaux répartis en quatre groupes de 10 à chaque concentration d'essai (1). Un plus petit nombre d'animaux d'expérience peut être utilisé, mais on recommande d'employer au moins 20 animaux par concentration, répartis dans au moins deux récipients contenant le même nombre d'animaux (par exemple, quatre récipients contenant cinq daphnies chacun). Notons que pour les essais où les animaux sont maintenus en groupe, il ne sera pas possible d'exprimer la capacité reproductrice en fonction du nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai, si des animaux parents meurent. Auquel cas, il faudra exprimer la capacité reproductrice par "le nombre total de descendants vivants produits par parent présent au début de l'essai".

#### 1.8.1.4 Alimentation

Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins tri-hebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Les écarts par rapport à cette fréquence (par exemple, dans les essais dynamiques) doivent être signalés.

Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents devrait, de préférence, se composer d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs des espèces suivantes : *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* [renommée *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] et *Scenedesmus subspicatus*. La nourriture devrait être dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (12) a montré que pour *Daphnia magna*, des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisaient pour produire le nombre de descendants requis selon les critères de validité. On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai ou utiliser des teneurs plus faibles au début, que l'on augmentera afin de tenir compte de la croissance des animaux parents. Dans ce cas, la ration devrait toujours contenir entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour, qui est la teneur recommandée.

Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (pour des raisons pratiques, car la mesure de la teneur en carbone prend beaucoup de temps), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme mettant en relation le paramètre de remplacement et la teneur en carbone de la culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'appendice 2). Les nomogrammes devraient être vérifiés au moins une fois par an, et plus souvent si les conditions de culture des algues ont changé. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (13).

Il convient d'administrer une suspension d'algues concentrée aux *Daphnia*, afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. On peut concentrer les algues par centrifugation, puis remise en suspension dans de l'eau distillée, de l'eau désionisée ou le milieu de culture des *Daphnia*.

#### 1.8.1.5 Lumière

16 heures de lumière à une intensité ne dépassant pas  $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 1.8.1.6 Température

La température des milieux d'essai devrait être comprise entre 18 et 22 °C. Néanmoins, dans un même essai, la température ne devrait pas, si possible varier de plus de 2 °C au sein de cet intervalle (par exemple, 18-20, 19-21 ou 20-22 °C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

#### 1.8.1.7 Aération

Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai.

### 1.8.2 Concentrations d'essai

Il faudrait normalement utiliser au moins cinq concentrations d'essai formant une série géométrique, de préférence espacées d'un facteur n'excédant pas 3,2. Il convient d'utiliser un nombre approprié de répliques pour chaque concentration d'essai (voir point 1.8.1.3). L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans le milieu d'essai.

Lors de la détermination de la plage de concentrations, il convient de tenir compte des éléments suivants :

i. Si l'on cherche à déterminer la CMEO et la CSEO, la plus faible concentration testée doit être suffisamment basse pour que le taux de fécondité à cette concentration ne soit pas significativement plus bas que celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il faudra recommencer l'essai en abaissant la concentration la plus basse.

ii. Si l'on cherche à déterminer la CMEO et la CSEO, la plus forte concentration testée devra être suffisamment élevée pour que le taux de fécondité à cette concentration soit significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il faudra recommencer l'essai en augmentant la concentration la plus forte.

iii. Si l'on veut estimer la  $CE_x$  relative aux effets sur la reproduction, il est conseillé d'utiliser des concentrations suffisantes pour définir cette  $CE_x$  avec un niveau de confiance satisfaisant. Si l'on évalue la  $CE_{50}$  relative aux effets sur la reproduction, il est souhaitable que la concentration d'essai la plus forte soit supérieure à cette  $CE_{50}$ . Si tel n'est pas le cas, on pourra toujours estimer la  $CE_{50}$ , mais l'intervalle de confiance sera très large et on risque de ne pas être en mesure d'évaluer la pertinence du modèle.

iv. Il vaut mieux éviter d'inclure dans la plage des concentrations d'essai celles qui ont un effet statistiquement significatif sur la survie des adultes, parce que, ce faisant, on modifierait la nature de l'essai qui passerait d'un simple essai de reproduction à un essai combiné de reproduction et de mortalité, ce qui exige une analyse statistique bien plus complexe.

Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (résultant d'une étude de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter la sélection de concentrations d'essai pertinentes.

Lorsqu'un solvant ou un dispersant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir point 1.6.4), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

### 1.8.3 Témoins

Il faudrait tester une série de témoins du milieu d'essai et, le cas échéant, une série de témoins contenant le solvant ou le dispersant, parallèlement aux séries traitées avec la substance d'essai. Le cas échéant, la concentration du solvant ou du dispersant doit être identique à celle utilisée dans les récipients contenant la substance d'essai. Il convient d'utiliser un nombre approprié de répliques (voir point 1.8.1.3).

Généralement, dans un essai correctement mené, le coefficient de variation autour du nombre moyen de descendants vivants produits par animal parent dans le ou les groupes témoins devrait être  $\leq 25\%$ , et cette information doit être communiquée pour les essais où les animaux sont maintenus dans des récipients individuels.

### 1.8.4 Renouvellement du milieu d'essai

La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais devrait être au moins tri-hebdomadaire. Si les essais préliminaires de stabilité (voir point 1.4) montrent que la concentration de la substance d'essai n'est pas stable (c'est-à-dire en dehors de la fourchette de 80 - 120 % de la concentration nominale ou inférieure à 80 % de la concentration initiale mesurée) durant la période de renouvellement la plus longue (3 jours), il faut envisager de renouveler le milieu plus fréquemment ou de pratiquer un essai dynamique.

Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Le volume de milieu transféré avec les Daphnia doit être le plus petit possible.

### 1.8.5 Observations

Les résultats des observations effectuées durant l'essai doivent être consignés dans des fiches de données (voir exemples aux appendices 3 et 4). Si d'autres mesures s'imposent (voir points 1.3 et 1.8.8), des observations supplémentaires pourront être requises.

### 1.8.6 Descendants

Les descendants engendrés par chaque animal parent devraient de préférence être retirés et comptés quotidiennement, dès la première portée, pour ne pas qu'ils consomment la nourriture destinée aux adultes. Aux fins de la présente méthode, il ne faut compter que les descendants vivants, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts doit être signalée.

### 1.8.7 Mortalité

La mortalité des animaux parents doit être notée, de préférence quotidiennement, et au moins à chaque comptage des descendants.

### 1.8.8 Autres paramètres

Bien que la présente méthode vise avant tout à évaluer les effets sur la reproduction, il se peut que d'autres effets soient suffisamment quantifiés pour se prêter à l'analyse statistique. La mesure de la croissance est très intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur les éventuels effets sublétaux, ce qui peut se révéler plus utile que les seules données de reproduction. On préconise de mesurer la longueur des animaux parents (la longueur du corps sans l'épine anale) à la fin de l'essai. D'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés : le moment de la première portée (et des portées suivantes), le nombre et la taille des portées par animal, le nombre de portées avortées, la présence de mâles ou d'éphippies et, éventuellement, le taux intrinsèque d'accroissement de la population.

### 1.8.9 Fréquence des analyses quantitatives et des mesures

La concentration d'oxygène, la température, la dureté et le pH doivent être mesurés au moins une fois par semaine, avant et après le renouvellement des milieux, chez les témoins et dans les récipients qui renferment la concentration la plus élevée de la substance d'essai.

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

Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration de la substance d'essai ne s'écartera pas de plus de 20 % de la concentration nominale (c'est-à-dire qu'elle restera comprise dans un intervalle de 80 à 120 % - voir points 1.4 et 1.8.4), on recommande, au minimum, d'analyser les concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse juste après leur préparation et au moment de leur renouvellement au cours de la première semaine de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, juste après la préparation de la solution et au moment du renouvellement). Ces déterminations devraient ensuite être répétées selon une fréquence au moins hebdomadaire.

S'agissant des essais où la concentration n'est pas supposée demeurer dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, juste après leur préparation et au moment du renouvellement. Cependant, pour les essais où la concentration initiale mesurée de la substance d'essai sort de l'intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration nominale, mais pour lesquels on peut montrer de façon suffisamment convaincante que les concentrations initiales sont répétibles et stables (c'est-à-dire comprises dans un intervalle de 80 à 120 % des concentrations initiales), les déterminations chimiques pourraient se limiter durant les deuxième et troisième semaines aux concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse. En tout état de cause, la détermination de la concentration de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être effectuée que sur une seule réplique de chaque concentration d'essai.

Si on pratique un essai dynamique, il convient de recourir à un régime de prélèvements identique à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais l'analyse des solutions "anciennes" ne s'applique pas ici). Toutefois, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements durant la première semaine (par exemple, trois séries de mesures) afin de vérifier la stabilité des concentrations d'essai. Dans ces types d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai doivent être contrôlés chaque jour.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu être correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration initiale mesurée ou nominale, les résultats peuvent être déduits des valeurs initiales mesurées ou nominales. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à  $\pm 20\%$ , les résultats devraient être exprimés par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir appendice 5).

## 2. RESULTATS ET RAPPORT

### 2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

L'objectif de cet essai est de déterminer l'effet de la substance à tester sur le nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai. Le nombre total de descendants par animal parent doit être calculé pour chaque récipient d'essai (autrement dit, pour chaque récipient de même concentration). Si, dans un récipient, un animal parent meurt durant l'essai ou se révèle être un mâle, ce récipient est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de récipients de même concentration.

Pour l'estimation de la CMEO et, par conséquent, de la CSEO relatives aux effets du produit chimique sur la capacité reproductrice, il est nécessaire de calculer la moyenne de la capacité reproductrice à chaque concentration pour tous les récipients, ainsi que l'écart-type résiduel groupé, et ce calcul peut être effectué à l'aide de l'analyse de la variance. La moyenne pour chaque concentration doit ensuite être comparée à la moyenne pour les témoins, par une méthode appropriée de comparaisons multiples. Les tests de Dunnett ou de Williams peuvent convenir (14) (15) (16) (17). Il est nécessaire de vérifier l'hypothèse (de l'analyse de la variance) concernant l'homogénéité de la variance. On recommande d'effectuer cette vérification sur un graphique plutôt que par un test formel de signification (18); le test de Barlett convient également. Si cette hypothèse n'est pas vérifiée, il faut envisager de transformer les résultats afin d'homogénéiser les variances avant d'effectuer l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse de la variance pondérée. La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance (c'est-à-dire la plus petite différence significative) devrait être calculée et figurer dans le rapport.

Pour estimer la concentration qui provoquerait une réduction de 50 % de la capacité reproductrice ( $CE_{50}$ ), une courbe adéquate, comme la courbe logistique, devrait être ajustée aux résultats au moyen d'une méthode statistique telle que les moindres carrés. La courbe pourrait être paramétrée de manière que la  $CE_{50}$  et son écart-type puissent être estimés directement. Cela faciliterait considérablement le calcul des limites de confiance de la  $CE_{50}$ . À moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, il convient d'opter pour des limites de confiance de 95 % de part et d'autre. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Cela peut se faire graphiquement ou en recherchant la part du manque d'ajustement et la part des erreurs proprement dites dans la somme des carrés des résidus et en pratiquant un test de signification pour le manque d'ajustement. Comme les traitements qui entraînent un taux de fécondité élevé sont susceptibles de donner lieu à une plus grande variance dans le nombre de juvéniles produits que les traitements diminuant le taux de fécondité, il faudrait envisager de pondérer les valeurs observées afin de refléter les diverses variances dans les différents groupes traités (voir référence 18).

Dans l'analyse des données obtenues à partir de l'essai tournant final (2), une courbe logistique a été ajustée à l'aide du modèle suivant, mais d'autres modèles conviennent également :

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

où :

Y est le nombre total de juvéniles par animal parent survivant à la fin de l'essai (calculé pour chaque récipient),

x est la concentration de la substance,

c est le nombre escompté de juvéniles lorsque  $x = 0$

$x_0$  : la  $CE_{50}$  dans la population

b = paramètre caractérisant la pente

Ce modèle devrait convenir dans un grand nombre de situations, mais pas dans toutes. Il faudrait vérifier la validité du modèle comme indiqué ci-dessus. Dans certains cas, il pourrait être approprié d'utiliser un modèle d'hormèse dans lequel les basses concentrations donnent des effets plus marqués (19).

D'autres effets liés à la concentration, comme la  $CE_{10}$  ou la  $CE_{20}$ , peuvent également être estimés, mais il faudra probablement paramétrer le modèle autrement que dans le cas de la  $CE_{50}$ .

### 2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes :

#### 2.2.1 Substance d'essai

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

#### 2.2.2 Espèce d'expérience

— clone (préciser si son génotype a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si on utilise une espèce autre que *Daphnia magna*, il faut le signaler et le justifier.

#### 2.2.3 Conditions d'essai

— mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume, charge en nombre de *Daphnia* par litre);

— photopériode et intensité lumineuse;

— plan de l'essai (par exemple, nombre de récipients de même concentration, nombre de parents par récipient);

— détails du milieu de culture employé;

— le cas échéant, ajout de matière organique (préciser la composition, la source, la méthode de préparation, le COT et la DCO des solutions mères, une estimation du COT et de la DCO résultants dans le milieu d'essai);

— informations détaillées concernant l'alimentation, notamment quantité (en mg de C/*Daphnia*/jour) et programme (par exemple, type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture);

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant doivent être indiquées, le cas échéant).



### 2.2.4 Résultats

- résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai;
- concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai (l'appendice 4 fournit des exemples de fiches de données); le rendement de la méthode et sa limite de détermination devraient aussi être mentionnés;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (pH, température, concentration d'oxygène dissous, COT et/ ou DCO et dureté, le cas échéant) (l'appendice 3 fournit un exemple de fiche de données);
- dénombrement complet des descendants vivants de chaque animal parent (voir exemple de fiche de données à l'appendice 3);
- nombre et dates des décès chez les animaux parents (voir exemple de fiche de données à l'appendice 3);
- coefficient de variation de la fécondité chez les témoins (en fonction du nombre total de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai);
- graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent survivant (pour chaque récipient de même concentration) à la fin de l'essai, en fonction de la concentration de la substance d'essai;
- concentration minimale avec effet observé (CMEO) sur la reproduction, y compris une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui a pu être détecté, et concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) sur la reproduction; s'il y a lieu, mentionner également la CMEO et la CSEO sur la mortalité des animaux parents;
- s'il y a lieu,  $CE_x$  pour la reproduction et intervalles de confiance, ainsi qu'un graphique du modèle ajusté employé pour ces calculs, la pente de la courbe dose-effet et son écart-type;
- autres effets biologiques observés ou mesurés : indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (par exemple, croissance des animaux parents) avec justification appropriée, le cas échéant;
- justification de tout écart par rapport la présente méthode d'essai.

### 3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the Daphnia magna Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- (2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the Daphnia magna Reproduction Test. Paris 1997.
- (3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of Daphnia magna Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, pp. 257-265 (1995).
- (4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. *Protoplasma*, 154, pp. 25-33.
- (5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/ 600/ 4-90/ 027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- (6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing Daphnia magna. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, pp. 775-782.
- (7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, P.A. 20 pp.
- (8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of Daphnia magna Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In : Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- (9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with Daphnia magna. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26, pp. 1-8.
- (10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables : salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120 (2), pp. 185-196.
- (11) Korshikov (1990). Pseudokirchneriella subcapitata Hindak, F-1990. *Biologicie Prace*, 36, 209.
- (12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard Daphnia juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, pp. 2053-2058.
- (13) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton : the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, pp. 459- 466
- (14) Dunnett C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp. 1096-1121.
- (15) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*, 20, pp. 482-491.
- (16) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 27, pp. 103-117.
- (17) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 28, pp. 510-531.
- (18) Draper, N. R. et Smith, H (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, N.Y.
- (19) Brain, P. et Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, pp. 93-96.
- (20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). *A Primer of Population Biology*. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (21) Poole R.W. (1974). *An Introduction to quantitative Ecology*. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates : Jackknife vs bootstrap techniques. *Ecology*, 67, pp. 1156-1166.

## APPENDICE 1

## PRÉPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTièrement DÉFINIS

## Acclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (I) et M7. Ils ont toutefois obtenu certains résultats en procédant à une acclimatation progressive, c'est-à-dire en transférant les animaux de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

## PRÉPARATION

## Éléments en traces

Différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. À partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir:

Solutions mères I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4) (fois)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M 4	M 7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	5 000	2 000	–	–
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1 991	2 000	–	–
Les solutions de Na <sub>2</sub> EDTA et de FeSO <sub>4</sub> sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne:				
Solution 21 Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0



**Milieux M4 et M7**

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, des macronutriments et des vitamines suivants:

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4) (fois)	Quantité de solution mère ajoutée pour préparer le milieu (ml/l)	
			M 4	M 7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20	50	50

Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)

CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> * 9 H <sub>2</sub> O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	10 000	0,1	0,1
Solution mère de vitamines combinées	–	10 000	0,1	0,1

La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:

Chlorhydrate de thiamine	750	10 000	–	–
Cyanocobalamine (B <sub>12</sub> )	10	10 000	–	–
Biotine	7,5	10 000	–	–

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu de temps avant son utilisation.

Notes: Afin d'éviter la précipitation des sels lors de la préparation du milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500-800 ml d'eau désionisée et amener le volume à 1 litre.

La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea: an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, pp. 25-33.

## APPENDICE 2

## ANALYSE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT) ET ÉTABLISSEMENT D'UN NOMOGRAMME POUR LA TENEUR EN COT DES ALIMENTS À BASE D'ALGUES

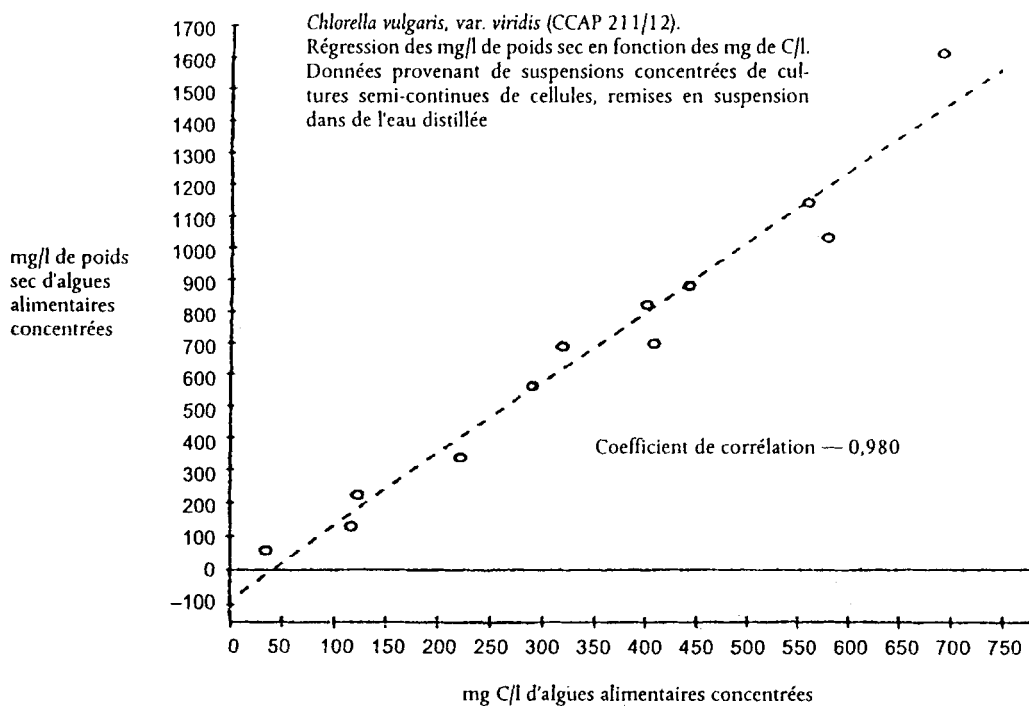
Il est admis que la teneur en carbone des algues alimentaires n'est généralement pas mesurée directement, mais déduite de corrélations (par nomogramme) avec des paramètres de remplacement comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière.

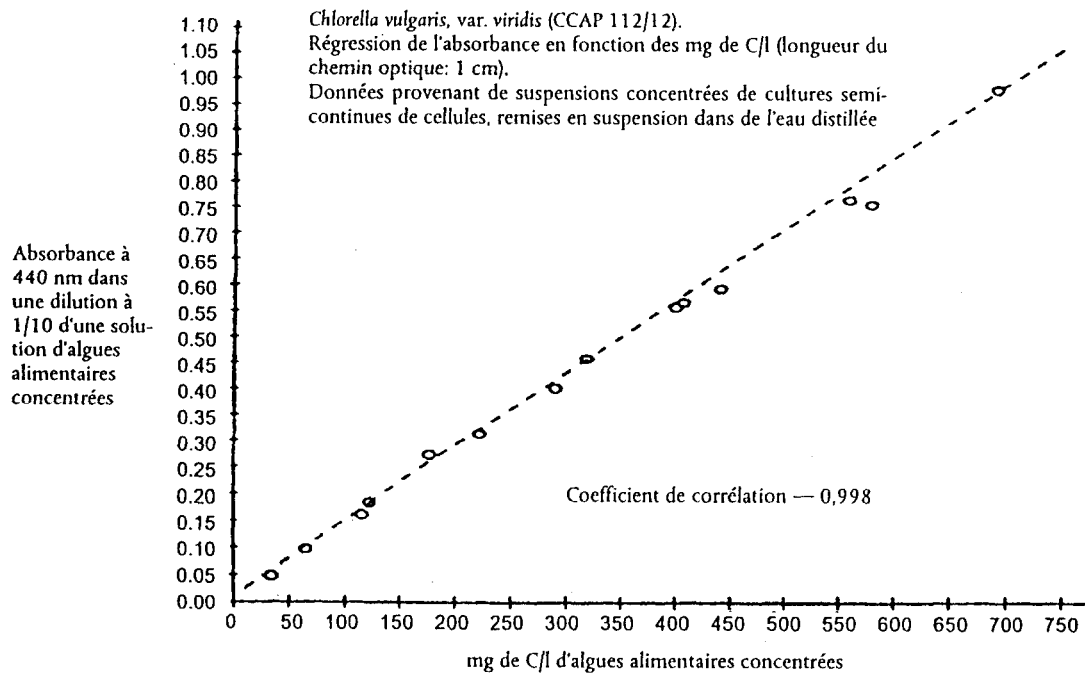
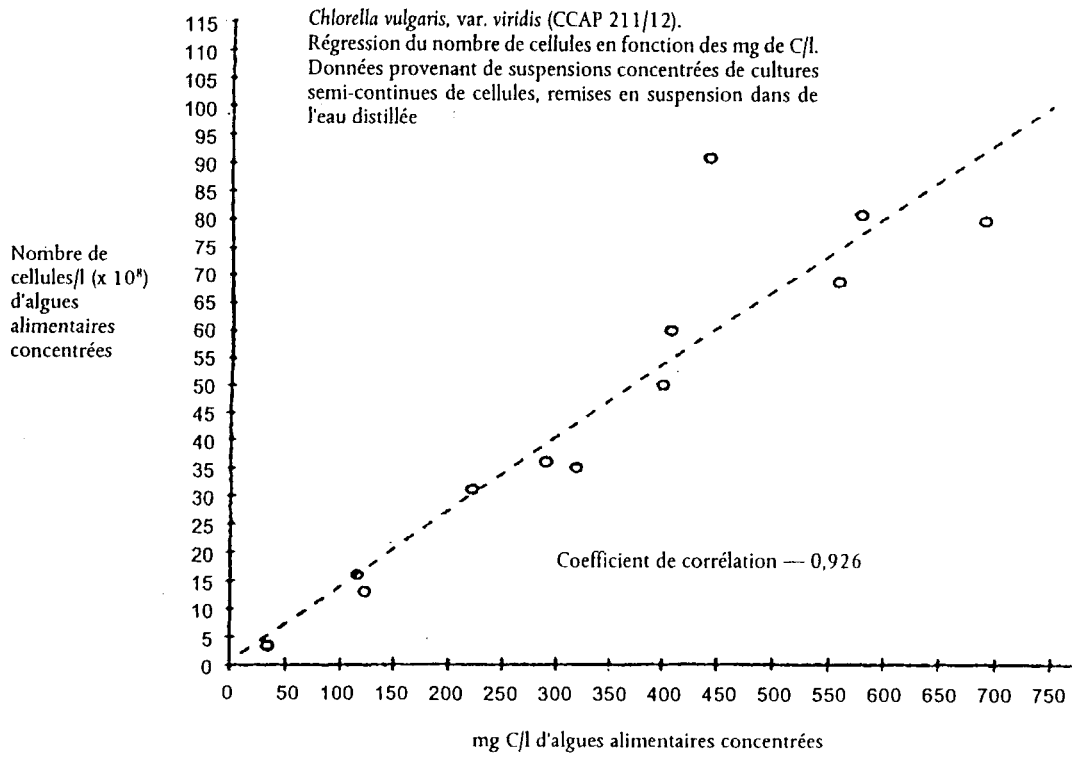
Il faudrait mesurer le COT par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes aux UV ou au persulfate (voir: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pour établir le nomogramme, il y a lieu d'isoler les algues du milieu de croissance par une centrifugation suivie d'une remise en suspension dans de l'eau distillée. On mesure le paramètre de remplacement et la teneur en COT dans chaque échantillon, produit en triple exemplaire. Les témoins contenant uniquement de l'eau distillée devraient être analysés et la teneur en COT déduite de celle de l'échantillon contenant les algues.

Les nomogrammes devraient être linéaires sur la plage prescrite des concentrations de carbone. Des exemples sont présentés ci-dessous.

NB: Ne pas utiliser pour les conversions; il est essentiel que les laboratoires établissent leurs propres nomogrammes.







## APPENDICE 4

## EXEMPLE DE FICHE DE DONNÉES POUR CONSIGNER LES RÉSULTATS DES ANALYSES CHIMIQUES

## a) Concentrations mesurées

Concentration nominale	Échantillon prélevé durant la première semaine		Échantillon prélevé durant la deuxième semaine		Échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement

## b) Concentrations mesurées en pourcentage de la concentration nominale

Concentration nominale	Échantillon prélevé durant la première semaine		Échantillon prélevé durant la deuxième semaine		Échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement

## APPENDICE 5

## CALCUL D'UNE MOYENNE PONDEREE DANS LE TEMPS

Moyenne pondérée dans le temps

Etant donné que la concentration de la substance d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre deux renouvellements du milieu, il est nécessaire de rechercher la concentration qui devrait être considérée comme représentative de la plage des concentrations appliquées aux Daphnia parents. Le choix devrait être guidé par des considérations tant biologiques que statistiques. Si on estime, par exemple, que les effets sur la reproduction sont surtout sensibles à la concentration maximale, il faut utiliser la concentration maximale. Si, par contre, on juge que c'est l'effet cumulé ou à long terme de la substance toxique qui est prépondérant, il est plus pertinent d'utiliser une concentration moyenne. Dans ce cas, la concentration moyenne pondérée dans le temps convient, puisqu'elle tient compte de la variation de la concentration instantanée en fonction du temps.

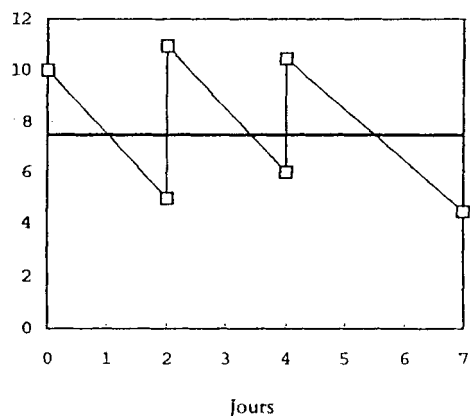


Figure 1 : Exemple de moyenne pondérée dans le temps

La figure 1 représente un essai (simplifié), d'une durée de sept jours, avec renouvellement du milieu aux jours 0, 2, et 4.

— La ligne fine en zigzag représente la concentration en fonction du temps. La concentration est censée diminuer suivant un schéma de décroissance exponentielle.

— Les six points portés sur le graphique représentent les concentrations mesurées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.

— La ligne épaisse représente la moyenne pondérée dans le temps.

La moyenne pondérée dans le temps est calculée de façon que l'aire sous la moyenne pondérée dans le temps soit égale à l'aire sous la courbe de concentration. Le calcul correspondant à l'exemple ci-dessus est illustré dans le tableau 1.

Tableau 1 : Calcul de la moyenne pondérée dans le temps

Renouvellement n°	Jours	Conc. 0	Conc. 1	Ln (Conc. 0)	Ln (Conc.1)	Aire	
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767	
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544	
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781	
Nombre total de jours : 7						Aire totale	50,091
						Moyenne PT	7,156

Jours correspond au nombre de jours de la période de renouvellement

Conc. 0 est la concentration mesurée au début de chaque période de renouvellement

Conc. 1 est la concentration mesurée à la fin de chaque période de renouvellement

Ln (Conc.0) est le logarithme népérien de Conc.0

Ln (Conc.1) est le logarithme népérien de Conc.1

Aire est l'aire sous la courbe exponentielle correspondant à chaque période de renouvellement. Elle se calcule par la formule suivante :

$$\text{Aire} = \frac{\text{Conc.0} - \text{Conc.1}}{\text{Ln}(\text{Conc.0}) - \text{Ln}(\text{Conc.1})} \times \text{jours}$$

La moyenne pondérée dans « (moyenne PT) » est l'« aire totale » divisée par le « nombre total de jours »

Bien entendu, dans le cas de l'essai de reproduction chez Daphnia, le tableau devrait être complété jusqu'à 21 jours.

Il est clair que lorsque les observations ne sont faites qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que la baisse de concentration est effectivement exponentielle. Une courbe différente donnerait lieu à un calcul différent de l'aire. Cependant, une baisse de concentration exponentielle est plausible et constitue probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Il convient toutefois d'être prudent si l'analyse chimique ne détecte aucune substance à la fin de la période de renouvellement. À moins de pouvoir estimer la vitesse à laquelle la substance a disparu de la solution, il est impossible d'obtenir une aire sous la courbe réaliste et, partant, une moyenne pondérée dans le temps qui soit raisonnable.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement

Mme M. AELVOET



## ANNEXE II

## Annexe VI

**CRITERES GENERAUX DE CLASSIFICATION ET D'ETIQUETAGE DES SUBSTANCES  
ET PREPARATIONS DANGEREUSES****SOMMAIRE**

1. INTRODUCTION GENERALE
2. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES
  - 2.1. Introduction
  - 2.2. Critères de classification, choix des symboles et indications de danger et choix des phrases indiquant les risques
    - 2.2.1. Substances et préparations explosibles
    - 2.2.2. Substances et préparations comburantes
    - 2.2.3. Substances et préparations extrêmement inflammables
    - 2.2.4. Substances et préparations facilement inflammables
    - 2.2.5. Substances et préparations inflammables
    - 2.2.6. Autres propriétés physico-chimiques
3. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES
  - 3.1. Introduction
  - 3.2. Critères de classification, choix des symboles et indications de danger et choix des phrases indiquant les risques
    - 3.2.1. Substances et préparations très toxiques
    - 3.2.2. Substances et préparations toxiques
    - 3.2.3. Substances et préparations nocives
    - 3.2.4. Commentaires relatifs à l'emploi de la phrase R48
    - 3.2.5. Substances et préparations corrosives
    - 3.2.6. Substances et préparations irritantes
    - 3.2.7. Sensibilisation
    - 3.2.8. Autres propriétés toxicologiques
4. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES EFFETS SPECIFIQUES SUR LA SANTE
  - 4.1. Introduction
  - 4.2. Critères de classification, indications de danger et choix des phrases indiquant les risques
    - 4.2.1. Substances cancérogènes
    - 4.2.2. Substances mutagènes
    - 4.2.3. Substances toxiques pour la reproduction
    - 4.2.4. Procédure pour la classification des préparations, en ce qui concerne les effets spécifiques sur la santé
5. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT
  - 5.1. Introduction
  - 5.2. Critères de classification, indications de danger et choix des phrases indiquant les risques
    - 5.2.1. Environnement aquatique
    - 5.2.2. Environnement non aquatique
6. CHOIX DES CONSEILS DE PRUDENCE
  - 6.1. Introduction
  - 6.2. Conseils de prudence pour les substances et les préparations
7. ETIQUETAGE
8. CAS PARTICULIERS : Substances
  - 8.1. Bouteilles de gaz transportables
  - 8.2. Récipients de gaz destinés au propane, au butane ou au gaz de pétrole liquéfié (GPL)
  - 8.3. Métaux sous forme massive
  - 8.4. Substances classées avec la phrase R65

9. CAS PARTICULIERS : Préparations
- 9.1. Préparations gazeuses (mélanges de gaz)
- 9.2. Récipients de gaz destinés à des préparations contenant du propane, du butane ou du gaz de pétrole liquéfié (GPL) nauséabonds
- 9.3. Alliages, préparations contenant des polymères et préparations contenant des élastomères
- 9.4. Préparations classées avec la phrase R65
- 9.5. Peroxydes organiques
- 9.6. Exigences supplémentaires d'étiquetage pour certaines préparations

## 1. INTRODUCTION GENERALE

1.1. La classification vise à identifier toutes les propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques des substances ou préparations, pouvant constituer un risque lors de la manipulation ou de l'utilisation normales de ces substances ou préparations. Après identification de chaque propriété dangereuse, la substance ou la préparation doit être étiquetée de manière à indiquer la ou les dangers, afin de protéger l'utilisateur, le grand public et l'environnement.

1.2. La présente annexe énumère les principes généraux régissant la classification et l'étiquetage des substances et préparations, visés à l'article 3, § 3 du présent arrêté et à l'article 4 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, ainsi que dans d'autres arrêtés relatifs aux préparations dangereuses.

Elle s'adresse à toute personne concernée (fabricants, importateurs, autorités nationales) par les méthodes de classification et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses.

1.3. Les prescriptions du présent arrêté et de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 ont pour objet de mettre à la disposition du grand public et des travailleurs un outil fondamental contenant des informations essentielles en matière de substances et préparations dangereuses. L'étiquette attire l'attention des personnes qui manipulent ou utilisent ces substances et préparations sur les dangers inhérents à certaines d'entre elles.

L'étiquette peut également avoir pour objet de fournir une information plus complète sur les mesures de prudence et les modalités d'utilisation des produits disponibles sous des formes différentes.

1.4. L'étiquette tient compte de tous les dangers potentiels susceptibles d'être liés à la manipulation et à l'utilisation normales des substances et préparations dangereuses sous la forme où elles sont mises sur le marché, mais non nécessairement sous n'importe quelle forme différente d'utilisation finale, par exemple à l'état dilué. Les dangers les plus sérieux sont illustrés par des symboles et ces dangers, ainsi que ceux qui découlent d'autres propriétés dangereuses, sont énoncés par des phrases types de risque tandis que les phrases indiquant des conseils de prudence précisent les précautions indispensables à respecter.

Dans le cas des substances, l'information est complétée par la mention du nom de la substance conforme à une nomenclature chimique reconnue au niveau international, de préférence le nom utilisé dans l'Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (Einecs) ou dans la Liste européenne des substances chimiques notifiées (Elincs), ainsi que par la mention du numéro CE, et des nom, adresse et numéro de téléphone de la personne, établie dans la Communauté, responsable de la mise sur le marché de la substance.

Dans le cas des préparations, l'information est complétée, en application de l'article 9, paragraphe 2, de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 par les indications suivantes :

- nom commercial ou désignation de la préparation,
- nom chimique de la ou des substances présentes dans la préparation, et
- nom, adresse complète et numéro de téléphone de la personne, établie dans la Communauté, responsable de la mise sur le marché de la préparation.

1.5. L'article 3, § 4 stipule que les fabricants, distributeurs et importateurs de substances dangereuses ne figurant pas encore à l'annexe I mais énumérées dans l'Einecs, sont tenus d'effectuer une recherche afin de prendre connaissance des données pertinentes accessibles concernant les propriétés de ces substances. Sur la base de ces informations, ils doivent emballer et provisoirement étiqueter ces substances conformément aux règles établies aux articles 7 et 8 et aux critères fixés dans la présente annexe.

### 1.6. Données requises pour la classification et l'étiquetage

1.6.1. Pour les substances, les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent être obtenues de la façon suivante :

(a) En ce qui concerne les substances qui nécessitent la communication des informations visées à l'annexe VII, la plupart des indications requises pour la classification et l'étiquetage figureront au « dossier de base ». Cette classification et cet étiquetage seront revus, le cas échéant, lorsqu'on disposera d'informations supplémentaires (annexe VIII);

(b) en ce qui concerne les autres substances (par exemple celles qui sont visées au point 1.5), les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent, le cas échéant, être obtenues à partir d'un certain nombre de sources différentes telles que :

- les résultats d'essais antérieurs;
- les informations exigées au titre de la réglementation internationale des transports de matières dangereuses;
- les informations tirées de travaux de référence et la bibliographie; ou
- les informations fondées sur l'expérience pratique.

Il est possible de prendre également en compte les résultats de relations structure/activité validées et les avis d'experts.

1.6.2. Pour les préparations, les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent en règle générale être obtenues :

(a) s'il s'agit de données physico-chimiques, par l'application des méthodes visées à l'annexe V. Cela vaut également pour les préparations relevant de l'arrêté royal du 28 février 1994, à moins que d'autres méthodes internationalement reconnues ne soient acceptables en application des dispositions des annexes VII et VIII de l'arrêté royal du 28 février 1994 (article 5, paragraphe 1<sup>er</sup>, point 1.5 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993). Pour les préparations gazeuses, une méthode de calcul peut être utilisée pour les propriétés d'inflammabilité et les propriétés comburantes (voir points 9.1.1.1 et 9.1.1.2). Pour les préparations non gazeuses contenant des peroxydes organiques, une méthode de calcul peut être utilisée pour les propriétés comburantes (voir point 2.2.2.1).

(b) s'il s'agit de données relatives aux effets sur la santé :

— par l'application des méthodes précisées à l'annexe V, à moins que, dans le cas des produits phytopharmaceutiques, d'autres méthodes internationalement reconnues ne soient acceptables, en application des dispositions des annexes VII et VIII de l'arrêté royal du 28 février 1994 (article 5, paragraphe 2, point 2.1, *b*) de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

— et/ou par l'application d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 2 et à l'annexe I, partie B, parties 1.1 à 1.6 et 2.1 à 2.5 de l'A.R. du 11 janvier 1993;

— dans le cas de R65, par l'application des règles énoncées au point 3.2.3;

— toutefois s'il s'agit de l'évaluation des propriétés cancérigènes ou mutagènes ou de la toxicité pour la reproduction, par l'application d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, §2 et à l'annexe I, partie B, parties 1.7. à 1.9. et partie 2.6 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

(c) s'il s'agit de données relatives aux propriétés écotoxicologiques

(i) en ce qui concerne la toxicité pour l'environnement aquatique uniquement :

— par l'application des méthodes spécifiées à l'annexe V, sous réserve des conditions mentionnées à l'annexe I, partie C, partie 3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, à moins que, dans le cas des produits phytopharmaceutiques, d'autres méthodes internationalement reconnues ne soient acceptables en application des dispositions des annexes VII et VIII de l'arrêté royal du 28 février 1994 (article 5, paragraphe 3, point 3.1, *b*) de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, ou

— par l'application d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 3 et à l'annexe I, partie C, parties 1 et 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

(ii) en ce qui concerne l'évaluation du potentiel de bio-accumulation (ou de la bio-accumulation effective), par la détermination de  $\log_{10} K_{ow}$  (ou du BCF), ou pour ce qui est de l'évaluation de la dégradabilité, par l'application d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, §3 et à l'annexe I, partie C, parties 1 et 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

(iii) en ce qui concerne les dangers pour la couche d'ozone, par l'application d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, §3 et à l'annexe I, partie C, parties 1 et 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

Remarque concernant la réalisation d'essais sur des animaux

La réalisation d'essais sur des animaux pour obtenir des données expérimentales est soumise aux prescriptions de l'arrêté royal du 14 novembre 1993 relatif à la protection des animaux d'expérience modifié par l'arrêté royal du 15 mai 2001.

Remarque concernant les propriétés physico-chimiques

Pour les peroxydes organiques et les préparations de peroxydes organiques, les données peuvent être obtenues par la méthode de calcul décrite au point 9.5. Pour les préparations gazeuses, une méthode de calcul peut être utilisée pour les propriétés d'inflammabilité et les propriétés comburantes (voir point 9).

### 1.7. Application des critères du guide

La classification doit couvrir les propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques des substances et préparations.

La classification des substances et préparations s'effectue conformément au point 1.6, sur la base des critères repris aux points 2 à 5 (substances) et aux points 2.3, 4.2.4 et 5 de la présente annexe. Tous les types de risques doivent être envisagés. Par exemple, une classification suivant le point 3.2.1 n'implique pas que l'on perde de vue les points 3.2.2 ou 3.2.4.

La sélection du ou (des) symbole(s) et de la ou (des) phrase(s) de risque s'effectue sur la base de la classification, de façon à garantir que la nature spécifique des dangers potentiels identifiés lors de la classification sera bien mentionnée sur l'étiquette.

Nonobstant les critères indiqués aux points 2.2.3, 2.2.4 et 2.2.5, les substances et préparations se trouvant sous forme d'aérosols sont soumises aux dispositions de l'arrêté royal du 14 avril 1978 relatif aux générateurs aérosols modifié et adapté au progrès technique.

#### 1.7.1. Définitions

On entend par « substances » les éléments chimiques et leurs composés à l'état naturel ou tels qu'obtenus par tout procédé de production, contenant tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté dérivant du procédé, à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

Une substance peut être très bien définie sur le plan chimique (par exemple l'acétone) ou être un mélange complexe de composants de composition variable (par exemple les distillats aromatiques). Pour certaines substances complexes, des composants individuels sont parfois identifiés.

On entend par « préparations » les mélanges ou solutions composés de deux substances ou plus.

#### 1.7.2. Application des critères du guide pour les substances

Les critères d'orientation figurant dans la présente annexe sont directement applicables lorsque les données ont été obtenues à partir de méthodes d'essais comparables à celles qui sont reprises à l'annexe V. Dans les autres cas, on appréciera les données disponibles en comparant les méthodes d'essai utilisées avec celles qui figurent à l'annexe V et avec les règles appropriées de classification et d'étiquetage visées à la présente annexe.

Il peut arriver qu'il y ait un doute sur l'application des critères, notamment lorsque le recours à l'avis d'experts est nécessaire. Le fabricant, le distributeur ou l'importateur doit alors classer et étiqueter provisoirement la substance en cause en se basant sur une évaluation des éléments de preuve par une personne compétente.

Sans préjudice de l'article 3, § 4, dans les cas où la procédure précitée a été appliquée et où l'on craint d'éventuelles incohérences, on peut proposer la classification provisoire en vue de son introduction dans l'annexe I. Cette proposition doit être soumise à un des Etats membres, et être accompagnée de toutes les informations scientifiques nécessaires (voir également le point 4.1).

Une procédure similaire peut être appliquée dès lors que de nouvelles informations permettent de mettre en doute l'exactitude d'une entrée existante présente dans l'annexe I.

### 1.7.2.1. Classification des substances contenant des impuretés, des additifs ou des composants individuels

Lorsque des impuretés, des additifs ou des composants individuels de substances ont été identifiés, ils doivent être pris en compte si leur concentration est égale ou supérieure aux limites de concentration fixées à :

- 0,1 % pour les substances classées comme très toxiques, toxiques, cancérigènes (catégorie 1 ou 2), mutagènes (catégorie 1 ou 2), toxiques pour la reproduction (catégorie 1 ou 2), ou dangereuses pour l'environnement (affectées du symbole 'N', c'est-à-dire dangereuses pour l'environnement aquatique, dangereuses pour la couche d'ozone);
- 1 % pour les substances classées comme nocives, corrosives, irritantes, sensibilisantes, cancérigènes (catégorie 3), mutagènes (catégorie 3), toxiques pour la reproduction (catégorie 3) ou dangereuses pour l'environnement (non affectées du symbole 'N', c'est-à-dire nocives pour les organismes aquatiques, peuvent entraîner des effets néfastes à long terme),

sauf si des valeurs inférieures ont été fixées à l'annexe I.

À l'exception des substances spécifiquement reprises à l'annexe I, la classification doit s'effectuer conformément aux dispositions de l'article 5, § 1, § 2 et § 3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

Dans le cas de l'amiante (650-013-00-6), cette règle générale n'est pas d'application tant qu'une limite de concentration n'est pas fixée à l'annexe I. Les substances contenant de l'amiante doivent être classées et étiquetées selon les principes énoncés à l'article 3, § 4 du présent arrêté.

### 1.7.3. Application des critères du guide pour les préparations

Les critères d'orientation figurant à la présente annexe sont directement applicables lorsque les données ont été obtenues à partir de méthodes d'essai comparables à celles qui sont reprises à l'annexe V, à l'exception des critères du point 4 auxquels s'applique uniquement la méthode conventionnelle. Une méthode conventionnelle est également applicable en ce qui concerne les critères du point 5, à l'exception de la toxicité aquatique, sous réserve des conditions visées à l'annexe I, partie C, partie 3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993. Pour les préparations relevant de l'arrêté royal du 28 février 1994, les données relatives à la classification et à l'étiquetage peuvent également être obtenues par d'autres méthodes internationalement reconnues (voir dispositions spéciales au point 1.6 de la présente annexe). Dans les autres cas, on appréciera les données disponibles en comparant les méthodes d'essai utilisées avec celles qui figurent à l'annexe V et avec les règles appropriées de classification et d'étiquetage, énoncées dans la présente annexe.

Si les risques pour la santé et pour l'environnement sont évalués en appliquant une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 2 et § 3 et à l'annexe I, partie B et partie C de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, il y a lieu d'utiliser les limites individuelles de concentration fixées :

- soit à l'annexe I du présent arrêté,
- soit à l'annexe I, partie B, partie 2 et/ou à l'annexe I, partie C, partie 2, de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances ne figurent pas à l'annexe I du présent arrêté ou y figurent sans limite de concentration.

Dans le cas des préparations contenant des mélanges de gaz, la classification relative aux effets sur la santé et sur l'environnement sera établie par la méthode de calcul, sur la base des limites individuelles de concentration fixées à l'annexe I du présent arrêté ou, si ces limites n'y figurent pas, sur la base des critères de l'annexe I, partie B et partie C de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

#### 1.7.3.1. Préparations ou substances décrites au point 1.7.2.1 utilisées comme composants d'une autre préparation

L'étiquetage de telles préparations doit être conforme aux dispositions de l'article 9, conformément aux principes énoncés aux articles 3 et 4 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993. Dans certains cas, les informations figurant sur l'étiquette de la préparation ou de la substance décrite au point 1.7.2.1 sont néanmoins insuffisantes pour permettre à d'autres fabricants, désireux de l'utiliser comme constituant de leur(s) propre(s) préparation(s), d'effectuer correctement la classification et l'étiquetage de leur(s) préparation(s).

Dans ces cas, la personne établie dans la Communauté responsable de la mise sur le marché de la préparation initiale ou de la substance initiale décrite au point 1.7.2.1, qu'elle en soit le fabricant, l'importateur ou le distributeur, doit fournir, sur demande justifiée et dès que possible, toutes les données nécessaires sur les substances dangereuses présentes pour permettre une classification et un étiquetage corrects de la nouvelle préparation. Ces données sont également nécessaires pour permettre à la personne responsable de la mise sur le marché de la nouvelle préparation de se conformer aux autres prescriptions de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

## 2. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

### 2.1. Introduction

Les méthodes d'essai relatives aux propriétés d'explosibilité, aux propriétés comburantes et aux propriétés d'inflammabilité figurant à l'annexe V servent à conférer une signification spécifique aux définitions générales données à l'article 1<sup>er</sup>, paragraphe 4, points a) à e). Les critères suivent directement les méthodes d'essai spécifiées à l'annexe V, dans la mesure où ceux-ci sont mentionnés.

S'il existe une information adéquate montrant que, dans la pratique, les propriétés physico-chimiques des substances et préparations (à l'exception des peroxydes organiques) diffèrent de celles qui résultent de l'application des méthodes d'essai figurant à l'annexe V, ces substances et préparations devront être classées en fonction du risque qu'elles peuvent présenter pour les personnes qui les manipulent ou pour d'autres personnes.

### 2.2. Critères de classification, choix des symboles et indications de danger et choix des phrases indiquant les risques

Dans le cas des préparations, il faut prendre en considération les critères visés à l'article 5, §1<sup>er</sup> de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

#### 2.2.1. Substances et préparations explosibles

Les substances et préparations seront classées comme explosibles et caractérisées par le symbole « E » et par l'indication de danger « explosif » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V et dans la mesure où elles sont explosibles sous leur forme commercialisée. L'inscription d'une phrase indiquant les risques est obligatoire; elle sera libellée compte tenu de ce qui suit :

R2 Risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition

- Substances et préparations, sauf les exceptions indiquées ci-dessous.

R3 Grand risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition

- Substances et préparations particulièrement sensibles telles que les sels de l'acide picrique, le tétranitrate de pentaérythritol (penthrite)

### 2.2.2. Substances et préparations comburantes

Les substances et préparations seront classées comme comburantes et caractérisées par le symbole « O » et par l'indication de danger « comburant » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. L'inscription d'une phrase indiquant les risques est obligatoire; elle sera libellée sur la base des résultats des essais, compte tenu de ce qui suit :

R7 Peut provoquer un incendie

— Peroxydes organiques qui ont des caractéristiques inflammables, même lorsqu'ils ne sont pas en contact avec d'autres matériaux combustibles.

R8 Favorise l'inflammation des matières combustibles

— Autres substances et préparations comburantes, y compris les peroxydes inorganiques, qui peuvent enflammer ou augmenter le risque d'inflammabilité lorsqu'elles sont en contact avec des matériaux combustibles.

R9 Peut exploser en mélange avec des matières combustibles

— Autres substances et préparations, y compris les peroxydes inorganiques, devenant explosibles lorsqu'elles sont mélangées avec des matériaux combustibles, par exemple certains chlorates.

#### 2.2.2.1. Remarques relatives aux peroxydes

En ce qui concerne les propriétés explosibles, un peroxyde organique ou une préparation de peroxyde organique sont classés, sous la forme sous laquelle ils sont mis sur le marché, selon les critères énoncés au point 2.2.1, sur la base d'essais réalisés conformément aux méthodes décrites à l'annexe V.

En ce qui concerne les propriétés comburantes, les méthodes existant à l'annexe V ne peuvent pas s'appliquer aux peroxydes organiques.

Pour les substances, les peroxydes organiques qui ne sont pas déjà classés comme explosibles sont classés comme dangereux sur la base de leur structure (par exemple, R-O-O-H; R<sub>1</sub>-O-O-R<sub>2</sub>).

Les préparations qui ne sont pas déjà classées comme explosibles seront classées à l'aide de la méthode de calcul basée sur la présence d'oxygène actif, présentée au point 9.5.

Tout peroxyde organique ou toute préparation de peroxyde organique qui ne sont pas déjà classés comme explosibles sont classés comme comburants si le peroxyde ou sa formulation contient :

— plus de 5 % de peroxydes organiques ou

— plus de 0,5 % d'oxygène disponible à partir des peroxydes organiques et plus de 5 % de peroxyde d'hydrogène.

#### 2.2.3. Substances et préparations extrêmement inflammables

Les substances et préparations seront classées comme extrêmement inflammables et caractérisées par le symbole « F+ » et par l'indication de danger « extrêmement inflammable » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. La phrase indiquant les risques sera attribuée selon les critères suivants :

R12 Extrêmement inflammable

— Substances et préparations liquides dont le point d'éclair est inférieur à 0 °C et la température d'ébullition (ou bien, dans le cas d'un intervalle de distillation, la température initiale d'ébullition) inférieure ou égale à 35 °C.

— Substances et préparations gazeuses qui, à température et à pression ambiante, sont inflammables à l'air.

#### 2.2.4. Substances et préparations facilement inflammables

Les substances et préparations seront classées comme facilement inflammables et caractérisées par le symbole « F » et par l'indication de danger « facilement inflammable » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. Des phrases indiquant les risques seront attribuées selon les critères suivants :

R11 Facilement inflammable

— Substances et préparations solides, susceptibles de s'enflammer facilement après un bref contact avec une source d'inflammation, et qui continuent à brûler ou à se consumer après élimination de cette source.

— Substances et préparations liquides dont le point d'éclair est inférieur à 21 °C, mais qui ne sont pas extrêmement inflammables.

R15 Au contact de l'eau, dégage des gaz extrêmement inflammables

— Substances et préparations qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent des gaz extrêmement inflammables en quantités dangereuses à raison de 1 l/kg/h au minimum.

R17 Spontanément inflammable à l'air

— Substances et préparations susceptibles de s'échauffer et, finalement, de s'enflammer au contact de l'air à la température ambiante, sans apport d'énergie.

#### 2.2.5. Substances et préparations inflammables

Les substances et préparations seront classées comme inflammables en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. La phrase indiquant les risques sera attribuée selon les critères suivants :

R10 Inflammable

— Substances et préparations liquides dont le point d'éclair est égal ou supérieur à 21 °C et inférieur ou égal à 55 °C.

Toutefois, en pratique, il a été démontré que les préparations ayant un point d'éclair égal ou supérieur à 21 °C et inférieur ou égal à 55 °C n'ont pas besoin d'être classées inflammables si la préparation ne peut en aucune façon favoriser la combustion et seulement s'il n'y a aucun risque à craindre pour les personnes manipulant ces préparations ou pour les autres personnes.

#### 2.2.6. Autres propriétés physico-chimiques

Des phrases complémentaires indiquant les risques seront attribuées aux substances et préparations classées conformément aux points 2.2.1 à 2.2.5 ci-dessus ou aux points 3, 4 et 5, compte tenu des critères suivants (sur la base de l'expérience acquise lors de l'élaboration de l'annexe I) :

R1 Explosif à l'état sec

Substances et préparations explosibles mises sur le marché en solution ou sous forme humide, par exemple la nitrocellulose contenant plus de 12,6 % d'azote.

R4 Forme des composés métalliques explosifs très sensibles

Substances et préparations susceptibles de donner naissance à des dérivés métalliques sensibles explosifs, par exemple l'acide picrique, l'acide styphnique.



R5 Danger d'explosion sous l'action de la chaleur

Substances et préparations instables à la chaleur, non classées comme explosibles, par exemple l'acide perchlorique > 50 %.

R6 Danger d'explosion en contact ou sans contact avec l'air

Substances et préparations instables à la température ambiante, par exemple l'acétylène.

R7 Peut provoquer un incendie

Substances et préparations réactives, par exemple le fluor, l'hydrosulfite de sodium.

R14 Réagit violemment au contact de l'eau

Substances et préparations réagissant fortement avec l'eau, par exemple le chlorure d'acétylène, les métaux alcalins, le tétrachlorure de titane.

R16 Peut exploser en mélange avec des substances comburantes

Substances et préparations réagissant de manière explosive en présence d'agents comburants, par exemple le phosphore rouge.

R18 Lors de l'utilisation, formation possible de mélange vapeur-air inflammable/explosif

Préparations non classées comme inflammables en tant que telles, contenant des composants volatils inflammables à l'air.

R19 Peut former des peroxydes explosifs

Substances et préparations susceptibles de former des peroxydes explosifs pendant le stockage, par exemple l'éther éthylique, le 1,4-dioxane.

R30 Peut devenir facilement inflammable pendant l'utilisation

Préparations non classées comme inflammables en tant que telles, mais susceptibles de devenir inflammables par perte de composants volatils non inflammables.

R44 Risque d'explosion si chauffé en ambiance confinée

S'applique aux substances et préparations qui ne sont pas en elles-mêmes classées comme explosibles conformément au point 2.2.1, mais qui peuvent néanmoins présenter en pratique des propriétés explosives lorsqu'elles sont chauffées dans une ambiance suffisamment confinée. Ainsi, certaines substances qui se décomposeraient d'une manière explosive si elles étaient chauffées dans un récipient en acier ne présentent pas cette caractéristique lorsqu'elles sont chauffées dans des récipients moins résistants.

Pour les autres phrases complémentaires indiquant les risques, voir le point 3.2.8.

### 3. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES PROPRIÉTÉS TOXICOLOGIQUES

#### 3.1. Introduction

3.1.1. La classification concerne à la fois les effets aigus et les effets à long terme des substances et préparations, que ces effets découlent d'une seule exposition ou d'expositions répétées ou prolongées.

Lorsqu'il peut être démontré, par des études épidémiologiques, par des études de cas scientifiquement fondées telles que spécifiées dans la présente annexe ou par l'expérience pratique statistiquement vérifiée, par exemple, par l'évaluation de données émanant de centres d'information antipoison ou concernant des maladies professionnelles, que les effets toxicologiques sur l'homme diffèrent de ceux observés lors de l'application des méthodes visées au point 1.6 de la présente annexe, la substance ou la préparation est alors classée en fonction de ses effets sur l'homme. Toutefois, les essais sur l'homme doivent être déconseillés et ne peuvent pas être utilisés, en règle générale, pour annuler des données positives issues d'essais sur des animaux.

L'arrêté royal du 14 novembre 1993 modifié par l'arrêté royal du 15 mai 2001 vise à protéger les animaux utilisés à des fins expérimentales et à d'autres fins scientifiques. Pour plusieurs types de toxicité, il existe des méthodes d'essai *in vitro* validées énumérées à l'annexe V du présent arrêté; ce sont ces méthodes qui, le cas échéant, doivent être utilisées.

3.1.2. La classification des substances doit s'opérer sur la base des données expérimentales disponibles, selon les critères suivants qui tiennent compte de l'importance de ces effets :

(a) pour la toxicité aiguë (effets létaux et irréversibles après une seule exposition), il faut utiliser les critères des points 3.2.1 à 3.2.3;

(b) pour la toxicité subaiguë, subchronique ou chronique, il faut utiliser les critères des points 3.2.2 à 3.2.4;

(c) pour les effets corrosifs et irritants, il faut utiliser les critères des points 3.2.5 et 3.2.6;

(d) pour les effets sensibilisants, il faut utiliser les critères du point 3.2.7;

(e) pour les effets spécifiques sur la santé (effets cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction), il faut utiliser les critères du point 4.

3.1.3. Pour les préparations, la classification relative au danger pour la santé s'effectue :

(a) sur la base d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 2 et à l'annexe I<sup>re</sup>, partie B de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, en l'absence de données expérimentales. Dans ce cas, la classification se fonde sur les limites individuelles de concentration issues :

— soit de l'annexe I du présent arrêté,

— soit de l'annexe I, partie B, partie 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances ne figurent pas à l'annexe I du présent arrêté ou y figurent sans limite de concentration;

(b) ou, lorsque des données expérimentales sont disponibles, selon les critères décrits au point 3.2.1, à l'exception des propriétés cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction visées au point 3.1.2 e), qui doivent être évaluées par une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 2 et à l'annexe I<sup>re</sup>, partie B, parties 1.7 à 1.9 et partie 2.6 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

Remarque : sans préjudice des dispositions de l'arrêté royal du 28 février 1994, c'est seulement quand la personne responsable de la mise sur le marché d'une préparation peut scientifiquement démontrer que les propriétés toxicologiques de cette préparation ne peuvent pas être correctement déterminées soit en appliquant la méthode visée au point 3.1.3 a) soit en s'appuyant sur les résultats disponibles d'essais réalisés sur des animaux, que les méthodes visées au point 3.1.3 b) peuvent être utilisées, à condition que cette utilisation soit justifiée ou spécifiquement autorisée au titre de l'article 3 de l'arrêté royal du 14 novembre 1993 modifié par l'arrêté royal du 15 mai 2001.

Quelle que soit la méthode employée pour évaluer le danger d'une préparation, il y a lieu de tenir compte de tous les effets dangereux sur la santé tels qu'ils sont définis à l'annexe I<sup>re</sup>, partie B, partie 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.



3.1.4. Lorsque la classification doit être établie à partir de résultats expérimentaux issus d'essais sur les animaux, les résultats doivent être validés pour l'homme, dans la mesure où ces essais révèlent, d'une manière appropriée, l'existence de risques pour l'homme.

3.1.5. La toxicité aiguë par voie orale de la substance ou de la préparation mise sur le marché peut être établie soit par une méthode permettant d'évaluer la valeur  $DL_{50}$ , soit en déterminant la dose discriminante (méthode de la dose fixée), soit encore en déterminant la gamme de valeurs d'exposition susceptibles d'entraîner une létalité (méthode de la classe de toxicité aiguë).

3.1.5.1. La dose discriminante est la dose qui entraîne une toxicité manifeste mais pas de mortalité et doit être une des quatre doses précisées à l'annexe V (5, 50, 500 ou 2 000 mg/kg de poids corporel).

Le concept de « toxicité manifeste » s'emploie pour désigner les effets toxiques, après exposition à la substance testée, dont la sévérité est telle que l'exposition à la dose immédiatement supérieure entraînerait probablement la mort.

Les résultats de l'essai à une dose donnée, suivant la méthode de la dose fixée peuvent être :

- survie inférieure à 100 %,
- survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste,
- survie égale à 100 %, mais pas de toxicité manifeste.

Les critères des points 3.2.1, 3.2.2 et 3.2.3 indiquent uniquement le résultat final de l'essai. Il y a lieu d'utiliser la dose de 2 000 mg/kg essentiellement pour obtenir des informations sur les effets toxiques des substances qui présentent une faible toxicité aiguë et qui ne sont pas classées sur la base de la toxicité aiguë.

La méthode de la dose fixée requiert dans certains cas d'effectuer l'essai à des doses supérieures ou inférieures, s'il n'a pas déjà été pratiqué à la dose pertinente. Il convient de se reporter au tableau d'évaluation de la méthode d'essai B.1 bis de l'annexe V.

3.1.5.2. La gamme de valeurs d'exposition susceptibles d'entraîner une létalité est déduite de l'absence ou de la présence observée de mortalité liée à une substance, suivant la méthode de la classe de toxicité aiguë. Pour le premier essai, on utilise une dose parmi trois doses de départ fixées (25, 200 ou 2 000 mg par kg de poids corporel).

La méthode de la classe de toxicité aiguë requiert dans certains cas d'effectuer l'essai à des doses supérieures ou inférieures, s'il n'a pas déjà été réalisé à la dose pertinente. Il convient de se reporter au tableau d'évaluation de la méthode d'essai B.1 ter de l'annexe V.

### 3.2. Critères de classification, choix des symboles et indication de danger et choix des phrases indiquant les risques

#### 3.2.1. Substances et préparations très toxiques

Les substances et préparations seront classées comme très toxiques et caractérisées par le symbole « T + » et l'indication de danger « très toxique » conformément aux critères spécifiés ci-après.

Les phrases indiquant les risques sont attribuées conformément aux critères suivants :

R28 Très toxique en cas d'ingestion

Toxicité aiguë :

- $DL_{50}$  par voie orale, rat :  $\leq 25$  mg/kg,
- survie inférieure à 100 % à 5 mg/kg par voie orale, rat (méthode de la dose fixée) ou
- mortalité élevée aux doses  $\leq 25$  mg/kg par voie orale, chez le rat, par la méthode de la classe de toxicité aiguë (pour l'interprétation des résultats d'essai, voir également les tableaux d'évaluation à l'appendice 2 de la méthode d'essai B.1 ter de l'annexe V).

R27 Très toxique par contact avec la peau

Toxicité aiguë :

- $DL_{50}$  par voie cutanée, rat ou lapin :  $\leq 50$  mg/kg.

R26 Très toxique par inhalation

Toxicité aiguë :

- $CL_{50}$  par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules :  $\leq 0,25$  mg/l/4 heures,
- $CL_{50}$  par inhalation, rat, pour les gaz et les vapeurs :  $\leq 0,5$  mg/l/4 heures.

R39 Danger d'effets irréversibles très graves

— Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au point 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/26/28, R39/27/28, R39/26/27/28.

#### 3.2.2. Substances et préparations toxiques

Les substances et préparations seront classées comme toxiques et caractérisées par le symbole « T » et l'indication « toxique » conformément aux critères spécifiés ci-après. Les phrases indiquant les risques sont attribuées conformément aux critères suivants :

R25 Toxique en cas d'ingestion

Toxicité aiguë :

- $DL_{50}$  par voie orale, rat :  $25 < DL_{50} \leq 200$  mg/kg,
- dose discriminante par voie orale, rat, 5 mg/kg : survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste, ou
- mortalité élevée à partir de 25 mg/kg et jusqu'à 200 mg/kg par voie orale, chez le rat, par la méthode de la classe de toxicité aiguë (pour l'interprétation des résultats d'essai, voir tableaux d'évaluation à l'appendice 2 de la méthode d'essai B.1 ter de l'annexe V).

R24 Toxique par contact avec la peau

Toxicité aiguë :

- $DL_{50}$  par voie cutanée, rat ou lapin :  $50 < DL_{50} \leq 400$  mg/kg.

**R23 Toxique par inhalation**

Toxicité aiguë :

- $CL_{50}$  par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules :  $0,25 < CL_{50} \leq 1$  mg/l/4 heures,
- $CL_{50}$  par inhalation, rat, pour les gaz et les vapeurs :  $0,5 < CL_{50} \leq 2$  mg/l/4 heures.

**R39 Danger d'effets irréversibles très graves**

— Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au point 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R39/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

**R48 Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée**

— Des lésions graves (troubles fonctionnels ou modifications morphologiques ayant une importance toxicologique) peuvent résulter d'une exposition répétée ou prolongée, par une voie adéquate.

Les substances et les préparations seront classées au moins comme toxiques lorsque ces effets sont observés à des doses sensiblement inférieures (c'est-à-dire dix fois) à celles fixées pour la phrase R48 au point 3.2.3.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/23/25, R48/24/25, R48/23/24/25.

**3.2.3. Substances et préparations nocives**

Les substances et préparations seront classées comme nocives et caractérisées par le symbole « Xn » et l'indication de danger « nocif » conformément aux critères énoncés ci-dessous. Les phrases indiquant les risques seront attribuées conformément aux critères suivants :

**R22 Nocif en cas d'ingestion**

Toxicité aiguë :

- $DL_{50}$  par voie orale, rat :  $200 < DL_{50} \leq 2\ 000$  mg/kg,
- dose discriminante par voie orale, rat, 50 mg/kg : survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste,
- survie inférieure à 100 % à 500 mg/kg par voie orale, rat (méthode de la dose fixée). Se reporter au tableau d'évaluation de la méthode d'essai B1bis de l'annexe V, ou
- mortalité élevée à partir de 200 mg/kg et jusqu'à 2000 mg/kg, par voie orale, chez le rat, par la méthode de la classe de toxicité aiguë (pour l'interprétation des résultats d'essai, voir tableaux d'évaluation à l'appendice 2 de la méthode d'essai B.1 ter de l'annexe V).

**R21 Nocif par contact avec la peau**

Toxicité aiguë :

- $DL_{50}$  par voie cutanée, rat ou lapin :  $400 < DL_{50} \leq 2\ 000$  mg/kg.

**R20 Nocif par inhalation**

Toxicité aiguë :

- $CL_{50}$  par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules :  $1 < CL_{50} \leq 5$  mg/litre/4 heures,
- $CL_{50}$  par inhalation, rat, pour les gaz ou les vapeurs :  $2 < CL_{50} \leq 20$  mg/litre/4 heures.

**R65 Nocif : peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion**

Les substances et préparations liquides présentant, pour l'homme, un danger en cas d'aspiration en raison de leur faible viscosité :

(a) Pour les substances et préparations contenant des hydrocarbures aliphatiques, alicycliques et aromatiques dans une concentration totale supérieure ou égale à 10 % et possédant

— soit un temps d'écoulement inférieur à 30 secondes dans une coupe ISO de 3 mm, conformément à la norme ISO 2431 (édition avril 1996/juillet 1999) relative aux Peintures et vernis - Détermination du temps d'écoulement au moyen de coupes d'écoulement,

— soit une viscosité cinématique inférieure à  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s à 40 °C, mesurée par un viscosimètre capillaire calibré en verre conformément à la norme ISO 3104 (ISO 3104, édition 1994) relative aux « Produits pétroliers - Liquides opaques et transparents - Détermination de la viscosité cinématique et calcul de la viscosité dynamique », ou à la norme ISO 3105 (ISO 3105, édition 1994) relative aux « Viscosimètres à capillaires en verre pour viscosité cinématique - Spécifications et instructions d'utilisation »,

— soit une viscosité cinématique inférieure à  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s à 40 °C, déduite de mesures par viscosimètre rotatif conformément à la norme ISO 3219 (ISO 3219, édition 1993) relative aux « Plastiques - Polymères/résines à l'état liquide, en émulsion ou en dispersion - Détermination de la viscosité au moyen d'un viscosimètre rotatif à gradient de vitesse de cisaillement défini ».

Il est à noter que les substances et préparations répondant à ces critères ne nécessitent pas d'être classées si leur tension superficielle moyenne est supérieure à 33 mN/m à 25 °C, mesurée par tensiomètre du Nouy, ou selon les méthodes d'essai indiquées à l'annexe V, partie A.5.

(b) Pour les substances et préparations, sur la base de l'expérience pratique chez l'homme.

**R68 Possibilité d'effets irréversibles**

— Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au point 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R68/20, R68/21, R68/22, R68/20/21, R68/20/22, R68/21/22, R68/20/21/22.

**R48 Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée**

— Des lésions graves (troubles fonctionnels ou modifications morphologiques caractérisés ayant une importance toxicologique) peuvent résulter d'une exposition répétée ou prolongée, par une voie adéquate.

Les substances et les préparations seront classées au moins comme nocives lorsque ces effets sont observés à des doses de l'ordre de :

- voie orale, rat  $\leq 50$  mg/kg (poids corporel)/jour,
- voie cutanée, rat ou lapin  $\leq 100$  mg/kg (poids corporel)/jour,
- par inhalation, rat  $\leq 0,25$  mg/l, 6 heures/jour.

Ces valeurs indicatives peuvent s'appliquer directement lorsque les lésions graves ont été constatées au cours d'une étude de toxicité subchronique (90 jours). Pour l'interprétation des résultats d'une étude de toxicité subaiguë (28 jours), ces chiffres doivent être multipliés par trois environ. Si une étude de toxicité chronique (2 ans) est disponible, elle doit être examinée cas par cas. Si l'on dispose des résultats d'études de durées différentes, ceux de l'étude la plus longue doivent normalement être retenus.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

### 3.2.3.1. Commentaires relatifs aux substances volatiles

Pour certaines substances à concentration de vapeur saturante élevée, certains éléments peuvent indiquer des effets préoccupants. De telles substances peuvent ne pas être classées selon les critères relatifs aux effets sur la santé repris dans le présent guide (point 3.2.3) ou ne pas être couvertes par les dispositions du point 3.2.8. Cependant, lorsqu'il existe des preuves adéquates que ces substances peuvent présenter un risque lié à une manipulation et à une utilisation normales, la classification à l'annexe I peut s'avérer nécessaire, cas par cas.

### 3.2.4. Commentaires relatifs à l'emploi de la phrase R48

L'emploi de cette phrase de risque fait référence à la gamme spécifique d'effets biologiques, dans les termes décrits ci-après. Pour l'application de cette phrase de risque, il faut considérer que les lésions graves pour la santé incluent la mort, les troubles fonctionnels évidents ou les modifications morphologiques significatives du point de vue toxicologique. Cela est important particulièrement lorsque ces modifications sont irréversibles. Il y a également lieu de considérer non seulement les modifications graves spécifiques à un seul organe ou système biologique, mais aussi les modifications généralisées présentant un caractère moins grave portant sur plusieurs organes ou les modifications graves de l'état de santé général.

Pour déterminer les preuves indiquant ces types d'effets, il y a lieu de se référer aux lignes directrices ci-après.

#### 1. Preuves indiquant que la phrase R48 doit être appliquée :

- (a) morts liées à la substance;
- (b) (i) modifications fonctionnelles majeures du système nerveux central ou périphérique, y compris la vue, l'ouïe et l'odorat, déterminées par des observations cliniques ou d'autres méthodes appropriées (par exemple électrophysiologiques);
- (ii) modifications fonctionnelles majeures d'un autre organe (par exemple les poumons);
- (c) toute modification importante des paramètres de la biochimie clinique, de l'hématologie ou de l'analyse d'urine qui révèle un dysfonctionnement grave d'un organe. Les troubles hématologiques sont considérés comme particulièrement importants s'il apparaît qu'ils sont dus à la diminution de la production des globules par la moelle osseuse;
- (d) dommages graves sur un organe, observés au microscope après autopsie :
  - (i) nécrose étendue ou grave, fibrose ou formation de granulomes dans les organes vitaux ayant une capacité régénératrice (par exemple le foie);
  - (ii) modifications morphologiques graves qui sont potentiellement réversibles mais qui indiquent clairement un dysfonctionnement organique prononcé (par exemple infiltration graisseuse grave du foie, nécrose tubulaire aiguë grave du rein, gastrite ulcéreuse); ou
  - (iii) mise en évidence d'une mortalité cellulaire importante dans des organes vitaux incapables de se régénérer (par exemple fibrose du myocarde ou dégénérescence rétrograde d'un nerf) ou dans les populations de cellules souches (par exemple aplasie ou hypoplasie de la moelle osseuse).

Les preuves mentionnées ci-dessus seront la plupart du temps obtenues par des expériences sur des animaux. Lorsque l'on considère les données issues de l'expérience pratique, une attention particulière doit être accordée aux niveaux d'exposition.

#### 2. Preuves indiquant que la phrase R48 ne doit pas être appliquée :

L'emploi de cette phrase de risque est limité aux « lésions graves pour la santé en cas d'exposition prolongée ». Nombre d'effets liés aux substances pourraient être observés à la fois sur l'homme et sur l'animal, mais sans justifier l'emploi de la phrase R48. Ces effets ont de l'importance lorsque l'on tente de déterminer une dose sans effet pour une substance chimique. Les exemples de modifications bien établies qui ne justifieraient normalement pas une classification avec la phrase R48, sans tenir compte de leur signification, comprennent :

- (a) les observations cliniques ou modifications de l'augmentation du poids corporel, de la consommation de nourriture ou d'eau qui peuvent avoir une certaine importance toxicologique mais n'indiquent pas, en tant que telles, des « lésions graves »;
- (b) les légères modifications des paramètres de la biochimie clinique, de l'hématologie ou de l'analyse d'urine qui revêtent une importance toxicologique douteuse ou minime;
- (c) les modifications de poids d'organes sans preuve de dysfonctionnement organique;
- (d) les réactions adaptatives (par exemple migration des macrophages dans les poumons, hypertrophie du foie et induction enzymatique, réactions hyperplasiques aux substances irritantes); les effets locaux sur la peau produits par une application cutanée répétée d'une substance, qui seraient normalement mieux caractérisés par la phrase R38 « irritant pour la peau »; ou
- (e) lorsque l'on a démontré un mécanisme de toxicité spécifique de l'espèce animale (par exemple par des voies métaboliques spécifiques).

### 3.2.5. Substances et préparations corrosives

La substance ou préparation sera classée comme corrosive et caractérisée par le symbole « C » et par l'indication de danger « corrosif », conformément aux critères suivants :

— Une substance ou une préparation est considérée comme corrosive si, lorsqu'elle est appliquée sur la peau saine et intacte d'un animal, elle produit des destructions tissulaires sur toute la profondeur de la peau, chez un animal au moins, au cours de l'essai d'irritation cutanée cité à l'annexe V ou lors de l'application d'une méthode d'essai équivalente.

— La classification peut se baser sur les résultats d'essais *in vitro* validés tels que ceux cités à l'annexe V (B.40. Corrosion cutanée : essai de résistance électrique transcutanée sur peau de rat et essai sur modèle de peau humaine).

— Une substance ou une préparation doit également être considérée comme corrosive lorsque l'on peut prévoir le résultat de l'essai, par exemple en cas de réactions fortement acides ou alcalines, indiquées par un pH inférieur ou égal à 2 ou supérieur ou égal à 11,5. Néanmoins, lorsque la classification est fondée sur une valeur extrême de pH, il est également possible de tenir compte de la réserve acide ou alcaline (\*). Si la réserve acide ou alcaline donne à penser que la substance ou la préparation peut ne pas être corrosive, il y a lieu de poursuivre les essais pour confirmer l'hypothèse, de préférence en procédant à un test *in vitro* validé. L'argument de la réserve acide ou alcaline n'est pas suffisant, à lui seul, pour justifier la décision de ne pas classer une substance ou une préparation comme "corrosive".

Les phrases indiquant les risques sont attribuées conformément aux critères suivants :

R35 Provoque de graves brûlures

— Si, lors d'une application sur la peau saine et intacte d'un animal, des destructions tissulaires apparaissent sur toute la profondeur de la peau après un temps d'exposition ne dépassant pas trois minutes ou si un tel résultat est prévisible.

R34 Provoque des brûlures

— si, lors d'une application sur la peau saine et intacte d'un animal, des destructions tissulaires apparaissent sur toute la profondeur de la peau après un temps d'exposition ne dépassant pas quatre heures ou si un tel résultat est prévisible;

— hydroperoxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

Remarques :

Lorsque la classification est basée sur les résultats d'un test *in vitro* validé, il y a lieu d'utiliser la phrase R35 ou R34 suivant la capacité de l'essai à distinguer les effets correspondants.

Si la classification repose uniquement sur la constatation d'une valeur extrême de pH, il y a lieu d'utiliser la phrase R35.

### 3.2.6. Substances et préparations irritantes

Les substances et préparations non corrosives seront classées comme irritantes, caractérisées par le symbole « Xi » et l'indication de danger « irritant » conformément aux critères mentionnés ci-après.

#### 3.2.6.1. Inflammation de la peau

La phrase de risque suivante est attribuée conformément aux critères donnés :

R38 Irritant pour la peau

— Substances et préparations qui provoquent une inflammation importante de la peau, présente pendant au moins 24 heures après une période d'exposition ne dépassant pas quatre heures, déterminée chez le lapin conformément à la méthode d'essai d'irritation cutanée décrite à l'annexe V.

L'inflammation de la peau est importante si :

(a) la valeur moyenne des scores, pour l'ensemble des animaux d'essai, en ce qui concerne la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'œdème est égale ou supérieure à 2 ou

(b) si l'essai visé à l'annexe V a été réalisé sur trois animaux, lorsque l'on a constaté la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'œdème équivalant à une valeur moyenne égale ou supérieure à 2 pour chaque animal, chez deux animaux au moins.

Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48 et 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

L'inflammation de la peau est également importante si elle persiste sur au moins deux animaux à la fin de la période d'observation. Il convient de tenir compte des effets particuliers, par exemple hyperplasie, desquamation, décoloration, fissures, escarres et alopecie.

On peut aussi obtenir des données utiles à partir d'études d'exposition non aiguë sur les animaux (voir commentaires concernant R48, point 2.d). Les effets sont considérés comme importants s'ils sont comparables à ceux décrits ci-dessus.

— Substances et préparations qui provoquent une inflammation importante de la peau lors d'un contact instantané, prolongé ou répété, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

— Peroxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

Paresthésie :

La paresthésie provoquée chez l'homme par contact cutané avec des pesticides pyrèthrinoides n'est pas considérée comme un effet irritant à classer Xi; R38. Néanmoins, il convient d'appliquer la phrase S24 aux substances qui sont susceptibles de provoquer cet effet.

#### 3.2.6.2. Lésions oculaires

Les phrases de risque suivantes sont aussi attribuées conformément aux critères donnés :

R36 Irritant pour les yeux

— Substances et préparations qui, en cas d'application sur l'œil de l'animal, provoquent des lésions oculaires importantes qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Les lésions oculaires sont considérées comme importantes si la moyenne des scores de l'essai visé à l'annexe V a une des valeurs suivantes :

— opacité cornéenne égale ou supérieure à 2 mais inférieure à 3,

— lésion de l'iris égale ou supérieure à 1, inférieure ou égale à 1,5,

— rougeur de la conjonctive égale ou supérieure à 2,5,

— œdème de la conjonctive (chémosis) égal ou supérieur à 2,

ou bien si l'essai visé à l'annexe V a été réalisé sur trois animaux, lorsque les lésions sur au moins deux animaux sont équivalentes à l'une des valeurs précitées, sauf pour la lésion de l'iris où la valeur devra être égale ou supérieure à 1 mais inférieure à 2 et la rougeur de la conjonctive où la valeur devra être égale ou supérieure à 2,5.

Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48, 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

— Substances et préparations qui provoquent des lésions oculaires importantes, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

— Peroxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

R41 Risque de lésions oculaires graves

— Substances et préparations qui, en cas d'application sur l'œil de l'animal, provoquent des lésions oculaires graves qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Les lésions oculaires doivent être considérées comme graves si la moyenne des scores de l'essai d'irritation de l'œil visé à l'annexe V a une des valeurs suivantes :

— opacité cornéenne égale ou supérieure à 3,

— lésion de l'iris supérieure à 1,5.

Il en est de même si l'essai a été effectué sur trois animaux, lorsque ces lésions sur au moins deux animaux sont équivalentes à l'une des valeurs ci-après :

— opacité cornéenne égale ou supérieure à 3,

— lésion de l'iris égale à 2.



Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48, 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

Les lésions oculaires sont également graves lorsqu'elles persistent à la fin de la période d'observation.

Les lésions oculaires sont également graves si la substance ou préparation provoque une coloration irréversible des yeux.

— Substances et préparations qui provoquent de graves lésions oculaires, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

Remarque :

Lorsqu'une substance ou préparation est classée comme corrosive avec les phrases R34 ou R35, le risque de lésions oculaires graves est considéré comme implicite et la phrase R41 n'est pas mentionnée sur l'étiquette.

### 3.2.6.3. Irritation du système respiratoire

La phrase de risque suivante sera attribuée conformément aux critères donnés ci-dessous :

R37 Irritant pour les voies respiratoires

Substances et préparations qui causent une irritation grave du système respiratoire, sur la base :

— d'observations chez l'homme

— de résultats positifs obtenus au cours d'essais appropriés sur l'animal

Commentaires sur l'emploi de la phrase R37

Il convient, en interprétant les observations chez l'homme, de faire la distinction entre les effets entraînant une classification avec la phrase R48 (voir point 3.2.4) et les effets entraînant une classification avec la phrase R37. Les conditions entraînant normalement la classification avec R37 sont réversibles et généralement limitées aux voies respiratoires supérieures.

Des résultats positifs obtenus au cours d'essais appropriés chez l'animal peuvent inclure des données obtenues dans un essai de toxicité générale notamment des données histopathologiques concernant le système respiratoire. On peut également utiliser des données obtenues à partir de la mesure de la bradypnée expérimentale pour évaluer l'irritation des voies respiratoires.

### 3.2.7 Sensibilisation

#### 3.2.7.1 Sensibilisation par inhalation

Les substances et préparations seront classées sensibilisantes et caractérisées par le symbole « Xn », l'indication de danger « nocif » et la phrase de risque R42, conformément aux critères mentionnés ci-dessous :

R 42 Peut entraîner une sensibilisation par inhalation

— s'il est établi que la substance ou préparation concernée peut provoquer une hypersensibilité respiratoire spécifique chez l'homme,

— si des essais appropriés sur l'animal ont donné des résultats positifs ou

— si la substance est un isocyanate, sauf s'il existe des preuves que cet isocyanate précis ne provoque pas d'hypersensibilité respiratoire

Commentaires concernant l'utilisation de la phrase R42

Preuves d'effets chez l'homme

Les preuves que la substance ou préparation peut provoquer une hypersensibilité respiratoire spécifique seront en principe fondées sur l'expérience chez l'homme. Dans ce cadre, l'asthme est considéré comme une expression de l'hypersensibilité, mais d'autres réactions d'hypersensibilité comme la rhinite et l'alvéolite sont aussi prises en considération. Les manifestations observées devront avoir le caractère clinique d'une réaction allergique. Cependant, il n'est pas nécessaire de démontrer le caractère immunologique des mécanismes.

Lorsque les preuves proviennent de données d'exposition humaine, il est nécessaire pour décider de la classification, de tenir compte, outre les preuves fournies par les cas étudiés, des éléments suivants :

— importance de la population exposée

— étendue de l'exposition

Les preuves susmentionnées peuvent être :

— des antécédents cliniques et des résultats de tests fonctionnels respiratoires appropriés reliés à l'exposition à la substance, confirmés par d'autres preuves, par exemple :

— une structure chimique apparentée à des substances connues pour provoquer une hypersensibilité respiratoire;

— un test immunologique in vivo (par exemple : prick test cutané);

— un test immunologique in vitro (par exemple, analyse sérologique);

— des études mettant en évidence d'autres mécanismes spécifiques mais non immunologiques, par exemple une irritation légère répétée, des effets liés à une action pharmacologique, ou

— des résultats positifs obtenus lors de tests de provocation bronchique réalisés avec la substance et effectués selon des lignes directrices reconnues pour la détermination d'une réaction d'hypersensibilité spécifique.

Les antécédents cliniques doivent comprendre à la fois les antécédents médicaux et professionnels, afin de déterminer la relation entre l'exposition à une substance ou préparation particulière et le développement d'une hypersensibilité respiratoire. Les informations à prendre en compte portent notamment sur les facteurs d'aggravation aussi bien au domicile que sur le lieu de travail, sur l'apparition et l'évolution de la maladie, sur les antécédents familiaux et médicaux du patient. Les antécédents médicaux doivent également inclure la mention d'autres troubles allergiques ou respiratoires apparus depuis l'enfance, ainsi que les antécédents de tabagisme.

Les résultats positifs de tests de provocation bronchique sont considérés apporter par eux-mêmes des preuves suffisantes pour entraîner la classification. On reconnaît cependant que, dans la pratique, beaucoup des examens susmentionnés auront déjà été effectués.

Les substances qui provoquent des symptômes d'asthme par irritation uniquement chez les sujets présentant une hyperréactivité bronchique ne doivent pas être classées avec la phrase R42.

Etudes chez l'animal

Les données expérimentales susceptibles d'indiquer pour une substance ou préparation un potentiel sensibilisant par inhalation chez l'homme peuvent comprendre :

— des mesures des IgE (par exemple sur la souris), ou

— des réactions pulmonaires spécifiques chez le cobaye.

### 3.2.7.2. Sensibilisation par contact cutané

Les substances et préparations seront classées sensibilisantes et caractérisées par le symbole « Xi », l'indication de danger « irritant » et la phrase de risque R43 conformément aux critères mentionnés ci-dessous :

R43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

— Si l'expérience montre que la substance ou préparation peut provoquer une sensibilisation par contact avec la peau chez un nombre significatif de personnes, ou

— si des essais appropriés chez l'animal donnent des résultats positifs.

Commentaires concernant l'utilisation de la phrase R43

Preuves d'effets chez l'homme

Les preuves suivantes (expérience pratique) sont suffisantes pour classer une substance ou préparation avec la phrase R43 :

— résultats positifs de tests épicutanés (patch tests) appropriés obtenus en principe dans plus d'une clinique dermatologique; ou

— études épidémiologiques montrant l'apparition de dermatites de contact allergiques causées par la substance ou préparation. Les circonstances dans lesquelles une forte proportion des personnes exposées manifeste des symptômes caractéristiques doivent être étudiées avec une attention particulière, même si les cas sont peu nombreux; ou

— données positives obtenues au cours d'études expérimentales chez l'homme (voir également point 3.1.1).

Les éléments suivants sont suffisants pour classer une substance avec la phrase R43 lorsqu'ils sont étayés par des preuves supplémentaires :

— épisodes isolés de dermatite de contact allergique, ou

— études épidémiologiques pour lesquelles les éléments liés au hasard, les biais ou les facteurs de confusion n'ont pas été exclus avec un degré raisonnable de certitude.

Les preuves supplémentaires nécessaires pour étayer les éléments ci-dessus peuvent être notamment :

— des données obtenues au cours d'essais sur l'animal réalisés selon des lignes directrices reconnues, donnant des résultats ne satisfaisant pas les critères énoncés au point relatif aux études sur l'animal mais suffisamment proches des limites pour être considérés comme significatifs; ou

— des données obtenues par des méthodes non normalisées; ou

— des relations structure-activité appropriées.

Etudes chez l'animal

Des résultats positifs d'essais appropriés chez l'animal sont :

— dans le cas de la méthode d'essai de type adjuvant pour la sensibilisation de la peau décrite à l'annexe V, ou dans le cas d'autres méthodes d'essai de type adjuvant, une réponse d'au moins 30 % des animaux est considérée comme positive;

— pour toute autre méthode d'essai, une réponse d'au moins 15 % des animaux est considérée comme positive.

### 3.2.7.3. Urticaire immunologique de contact

Certaines substances ou préparations répondant aux critères correspondant à la phrase R42 peuvent en outre causer des urticaires immunologiques de contact. Dans ce cas, il convient d'introduire l'information concernant les urticaires de contact à l'aide de phrases S appropriées (généralement les phrases S24 et S36/37), et de la mentionner dans la fiche de données de sécurité.

Pour les substances ou préparations qui produisent des signes d'urticaire immunologique de contact mais qui ne répondent pas aux critères correspondant à la phrase R42, il convient d'envisager une classification avec la phrase R43.

Il n'existe pas de modèle animal reconnu pour identifier les substances causant des urticaires immunologiques de contact. La classification devra donc s'appuyer sur des preuves d'effets chez l'homme, similaires à celles concernant la sensibilisation cutanée (R43).

### 3.2.8. Autres propriétés toxicologiques

Des phrases de risque complémentaires seront attribuées aux substances et préparations classées conformément aux points 2.2.1 à 3.2.7 ou aux points 4 et 5, selon les critères suivants (sur la base de l'expérience acquise lors de l'élaboration de l'annexe I) :

R29 Au contact de l'eau, dégage des gaz toxiques

Substances et préparations qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent des gaz très toxiques/toxiques en quantités potentiellement dangereuses; par exemple, le phosphore d'aluminium, le pentasulfure de phosphore.

R31 Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique

Substances et préparations qui réagissent avec des acides en dégageant des gaz toxiques en quantités dangereuses; par exemple, l'hypochlorite de sodium, le polysulfure de baryum. En ce qui concerne les substances utilisées par le grand public, il serait préférable d'utiliser la phrase S50 : « Ne pas mélanger avec... (à préciser par le fabricant) ».

R32 Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique

Substances et préparations qui réagissent avec des acides en dégageant des gaz très toxiques en quantités dangereuses; par exemple les sels de l'acide cyanhydrique, l'azoture de sodium. En ce qui concerne les substances utilisées par le grand public, il serait préférable d'utiliser la phrase S50 : « Ne pas mélanger avec... (à préciser par le fabricant) ».

R33 Danger d'effets cumulatifs

Substances et préparations susceptibles de s'accumuler dans le corps humain et pouvant ainsi donner lieu à une certaine inquiétude, sans toutefois que cette accumulation soit telle qu'elle justifie l'utilisation de la phrase R48.

Pour les commentaires relatifs à l'emploi de cette phrase R, voir le point 4.2.3.3 pour les substances, et l'annexe II, point A.3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, pour les préparations.

R64 Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel

Substances et préparations qui, absorbées par des femmes, peuvent perturber l'allaitement ou qui peuvent être présentes (y compris sous forme de métabolites) dans le lait maternel en quantités suffisantes pour être préoccupantes pour la santé d'un enfant nourri au sein.

Pour les commentaires relatifs à l'emploi de cette phrase R, voir le point 4.2.3.3 pour les substances, et l'annexe II, point A.4 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 pour les préparations.

R66 L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau

Substances et préparations qui peuvent avoir des effets préoccupants, en raison d'un dessèchement, d'une desquamation ou de gerçures, mais ne répondant pas aux critères imputables à R38, sur la base suivante :

— soit une observation pratique consécutive à une manipulation et une utilisation normales,

— soit des éléments de preuve pertinents concernant les effets prévus sur la peau.

Voir également les points 1.6 et 1.7.



R67 L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges

Substances et préparations volatiles contenant des substances qui, par inhalation, peuvent provoquer des symptômes caractérisés de dépression du système nerveux central, et qui ne sont pas déjà classées d'après leur toxicité aiguë en cas d'inhalation (R20, R23, R26, R68/20, R39/23 ou R39/26).

Les éléments de preuve suivants sont utilisables :

(a) Etudes sur les animaux mettant en évidence des symptômes caractérisés de dépression du système nerveux central, tels qu'effets narcotiques, léthargie, manque de coordination (y compris perte du réflexe de redressement) et ataxie :

— à des concentrations ne dépassant pas 20 mg/l pour un temps d'exposition de 4 heures, ou

— si le rapport entre la concentration provoquant l'effet à  $\leq 4$  heures et la concentration de la vapeur saturante à 20 °C est  $\leq 1/10$ .

(b) Expérience pratique sur l'homme (par exemple narcose, somnolence, vigilance réduite, perte de réflexes, manque de coordination, vertiges), sur la base de rapports dûment circonstanciés, dans des conditions d'exposition comparables à celles provoquant les effets précités sur les animaux.

Voir également les points 1.6 et 1.7.

Pour les autres phrases complémentaires de risque, voir le point 2.2.6.

#### Notes

(<sup>1</sup>) J.R. Young, M.J. How, A.P. Walker and W.M.H. Worth (1988) A Classification as corrosive or irritant to skin of preparations containing acidic or alkaline substances, without testing on animals [N]@ Toxic. In Vitro 2 (1): pp. 19-26

## 4. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES EFFETS SPECIFIQUES SUR LA SANTE

### 4.1. Introduction

4.1.1. Ce chapitre décrit la procédure de classification des substances susceptibles d'entraîner les effets décrits ci-après. Pour les préparations, voir point 4.2.4.

4.1.2. Si un fabricant, un distributeur ou un importateur dispose d'informations indiquant qu'une substance devrait être classée et étiquetée conformément aux critères énoncés aux points 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3, il doit étiqueter provisoirement la substance conformément à ces critères, sur la base de l'appréciation des éléments de preuve par une personne compétente.

4.1.3. Le fabricant, le distributeur ou l'importateur doit remettre dans les plus brefs délais, à un Etat membre dans lequel une substance est mise sur le marché, un document résumant toutes les informations intéressant cette substance. Les informations utiles dans ce contexte comprennent en particulier toutes les données publiées ou non publiées nécessaires à la classification appropriée de la substance en question, en fonction de ses propriétés intrinsèques suivant les catégories définies à l'article 1, paragraphe 4, et conformément aux critères énoncés dans la présente annexe. Le résumé qui est remis doit comporter une bibliographie contenant toutes les références pertinentes et peut comprendre toute information intéressante non publiée.

4.1.4. En outre, un fabricant, un distributeur ou un importateur disposant de nouvelles informations intéressant la classification et l'étiquetage d'une substance conformément aux critères indiqués aux points 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3 doit remettre lesdites informations à un Etat membre où la substance est commercialisée.

4.1.5. Afin d'aboutir le plus rapidement possible à une classification uniforme dans la Communauté par la procédure prévue à l'article 28 de la directive 67/548/CEE modifiée et adaptée au progrès technique, les Etats membres disposant d'informations justifiant la classification d'une substance dans une de ces catégories, que ces informations aient été fournies ou non par le fabricant, doivent envoyer dans les meilleurs délais à la Commission lesdites informations, accompagnées de propositions de classification et d'étiquetage.

La Commission enverra aux autres Etats membres la proposition de classification et d'étiquetage qu'elle a reçue. Tout Etat membre peut demander à la Commission la communication des informations qu'elle a reçues.

Tout Etat membre qui, pour des raisons précises, estime inappropriés la classification et l'étiquetage suggérés en ce qui concerne les effets cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, le fait savoir à la Commission.

### 4.2. Critères de classification, indication de danger et choix des phrases indiquant les risques

#### 4.2.1. Substances cancérigènes

En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et eu égard à l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en trois catégories.

##### Catégorie 1

Substances que l'on sait être cancérigènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et l'apparition d'un cancer.

##### Catégorie 2

Substances devant être assimilées à des substances cancérigènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut provoquer un cancer. Cette présomption se fonde généralement sur :

— des études appropriées à long terme sur l'animal,

— d'autres informations appropriées.

##### Catégorie 3

Substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles, mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation satisfaisante. Il existe des informations issues d'études adéquates sur les animaux, mais elles sont insuffisantes pour classer la substance dans la catégorie 2.

#### 4.2.1.1. *Les symboles et phrases indiquant les risques particuliers ci-après s'appliquent.*

Catégories 1 et 2 :

Les substances classées comme cancérigènes de catégorie 1 ou 2 sont caractérisées par le symbole « T » et la phrase de risque

R45 Peut provoquer le cancer

Toutefois, pour les substances et préparations qui présentent un risque cancérigène uniquement par inhalation, par exemple les poussières, les vapeurs, les fumées (l'exposition par les autres voies, par exemple par ingestion ou par contact avec la peau, ne présentant aucun risque cancérigène), il convient d'utiliser le symbole « T » et la phrase indiquant les risques particuliers ci-après :

R49 Peut provoquer le cancer par inhalation

Catégorie 3 :

Les substances classées comme cancérigènes de catégorie 3 sont caractérisées par le symbole 'Xn' et la phrase de risque

R40 Effet cancérigène suspecté — preuves insuffisantes

#### 4.2.1.2. *Commentaires relatifs à la catégorisation des substances cancérigènes*

Le classement d'une substance en catégorie 1 repose sur des données épidémiologiques; le classement en catégorie 2 ou 3 s'effectue essentiellement à partir de résultats expérimentaux sur des animaux.

Pour la classification comme substance cancérigène de catégorie 2, il faut disposer soit de résultats positifs pour deux espèces animales, soit d'éléments positifs indiscutables pour une espèce, étayés par des éléments secondaires tels que des données sur la génotoxicité, des études métaboliques ou biochimiques, l'induction de tumeurs bénignes, les relations structurelles avec d'autres substances cancérigènes connues ou des données tirées d'études épidémiologiques suggérant une association.

La catégorie 3 comprend en réalité deux sous-catégories :

(a) substances suffisamment étudiées, mais pour lesquelles il n'existe pas d'effets tumorigènes suffisants pour entraîner le classement en catégorie 2. Par ailleurs, des expériences complémentaires ne seraient pas susceptibles d'apporter d'autres informations pertinentes pour la classification;

(b) substances insuffisamment étudiées. Les données disponibles sont inadéquates mais sont préoccupantes pour l'homme. Cette classification est provisoire; des expériences complémentaires sont nécessaires avant de prendre la décision finale.

Pour opérer une distinction entre les catégories 2 et 3, sont considérés comme pertinents les arguments ci-après qui réduisent le caractère significatif de l'induction expérimentale d'une tumeur en ce qui concerne une exposition éventuelle de l'homme. Ces arguments, surtout associés, aboutiraient dans la plupart des cas à une classification dans la catégorie 3, même si des tumeurs ont été induites chez des animaux :

— effets cancérigènes uniquement à très fortes doses excédant la « dose maximale tolérée ». La dose maximale tolérée se caractérise par des effets toxiques qui, même s'ils ne modifient pas encore la durée de vie, s'accompagnent de modifications physiologiques telles qu'un retard de 10 % environ du gain de poids,

— apparition de tumeurs, surtout à fortes doses, uniquement dans des organes particuliers de certaines espèces connues pour leur propension à la formation d'un nombre important de tumeurs spontanées,

— apparition de tumeurs, uniquement au site d'application, dans des systèmes d'essai très sensibles (par exemple l'application intrapéritonéale ou sous-cutanée de certains composés actifs localement), si cette cible particulière n'est pas applicable à l'homme,

— absence de génotoxicité lors des essais à court terme in vivo et in vitro,

— existence d'un mécanisme secondaire d'action n'apparaissant qu'à partir d'un certain seuil (par exemple les effets hormonaux sur des organes cibles ou sur des mécanismes de régulation physiologique, la stimulation chronique de la prolifération des cellules),

— existence d'un mécanisme spécifique de l'espèce pour la formation de tumeurs (par exemple par des voies métaboliques spécifiques), non applicable à l'homme.

Pour effectuer une distinction entre une classification dans la catégorie 3 et aucune classification, sont considérés comme pertinents les arguments excluant une préoccupation pour l'homme :

— une substance ne doit être classée dans aucune des catégories si le mécanisme de formation expérimentale de tumeurs est clairement identifié, avec des éléments indiquant clairement que ce processus ne peut être extrapolé à l'homme,

— si les seules données disponibles sur les tumeurs concernent des tumeurs du foie sur certaines souches de souris, sans autre indication complémentaire, la substance peut n'être classée dans aucune des catégories précitées,

— il faut accorder une attention particulière aux cas pour lesquels les seules données disponibles sur les tumeurs concernent l'apparition de néoplasmes sur des sites et des souches où il est bien connu qu'ils apparaissent spontanément avec une incidence élevée.

#### 4.2.2. Substances mutagènes

4.2.2.1. En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et eu égard à l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en trois catégories :

Catégorie 1

Substances que l'on sait être mutagènes pour l'homme.

On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et des défauts génétiques héréditaires.

Catégorie 2

Substances devant être assimilées à des substances mutagènes pour l'homme.

On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut entraîner des défauts génétiques héréditaires. Cette présomption est généralement fondée sur :

— des études appropriées sur l'animal,

— d'autres informations appropriées.

Catégorie 3

Substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets mutagènes possibles. Des études appropriées de mutagénicité ont fourni des éléments, mais ils sont insuffisants pour classer ces substances dans la catégorie 2.

#### 4.2.2.2. Les symboles et phrases indiquant les risques particuliers ci-après s'appliquent.

##### Catégories 1 et 2 :

Les substances classées comme mutagènes de catégorie 1 ou 2 sont caractérisées par le symbole « T » et la phrase de risque

R46 Peut provoquer des altérations génétiques héréditaires

##### Catégorie 3 :

Les substances classées comme mutagènes de catégorie 3 sont caractérisées par le symbole « Xn » et la phrase de risque

R68 Possibilité d'effets irréversibles

#### 4.2.2.3. Commentaires relatifs à la catégorisation des substances mutagènes

##### Définition des termes :

Une mutation est une modification permanente du nombre ou de la structure du matériel génétique dans un organisme, qui aboutit à une modification des caractéristiques phénotypiques de l'organisme. Les altérations peuvent impliquer un gène unique, un ensemble de gènes ou un chromosome entier. Les effets concernant des gènes uniques peuvent résulter d'effets sur une seule des bases d'ADN (acide désoxyribonucléique) (mutations ponctuelles) ou de profondes modifications, y compris des délétions, au sein du gène. Les effets sur des chromosomes entiers peuvent entraîner des modifications structurelles ou numériques. Une mutation des cellules germinales dans les organismes à reproduction sexuée peut être transmise à la descendance. Un mutagène est un agent qui augmente l'apparition de mutations.

Il faut remarquer que les substances sont classées comme mutagènes en se référant spécifiquement aux défauts génétiques héréditaires. Toutefois, le type de résultats menant à une classification des produits chimiques dans la catégorie 3, « induction d'événements génétiquement importants dans les cellules somatiques », est généralement aussi considéré comme une alerte pour une éventuelle activité cancérogène.

La mise au point des méthodes d'essai de la mutagénicité est en constant développement. Pour de nombreux nouveaux essais, il n'existe ni protocoles normalisés, ni critères d'évaluation. Pour évaluer les données de mutagénicité, il faut considérer la qualité de l'exécution de l'essai et le taux de validation de la méthode d'essai.

##### Catégorie 1

Pour classer une substance dans la catégorie 1, la mise en évidence de mutations chez l'homme, issue d'études épidémiologiques sur la mutation humaine, sera nécessaire. Des exemples de telles substances sont inconnus à ce jour. On reconnaît qu'il est difficile d'obtenir des données fiables à partir d'études sur l'incidence des mutations dans des populations humaines ou sur les augmentations possibles de leurs fréquences.

##### Catégorie 2

Pour classer une substance dans la catégorie 2, il faut détenir des résultats positifs tirés d'études montrant : a) des effets mutagènes ou b) d'autres interactions cellulaires significatives pour la mutagénicité, dans les cellules germinales de mammifères *in vivo*, ou c) des effets mutagènes dans les cellules somatiques de mammifères *in vivo*, accompagnés d'éléments irréfutables indiquant que la substance, ou un métabolite significatif, atteint les cellules germinales.

En ce qui concerne la classification dans la catégorie 2, on considère actuellement comme appropriées les méthodes ci-après.

##### 2 (a) Essais de mutagénicité *in vivo* sur cellules germinales :

- essai de mutation d'un locus spécifique,
- essai de translocation héréditaire,
- essai de mutation létale dominante.

Ces essais démontrent vraiment l'existence d'une atteinte de la descendance ou d'un défaut de développement de l'embryon.

##### 2 (b) Essais *in vivo* montrant une interaction pertinente avec les cellules germinales (habituellement l'ADN) :

— essais d'anomalies chromosomiques, telles que détectées par analyse cytogénétique, y compris l'aneuploïdie, provoquée par une mauvaise ségrégation chromosomique,

- essais d'échanges de chromatides sœurs,
- essais de synthèse non programmée de l'ADN,
- essai de liaison (covalente) du mutagène à l'ADN de la cellule germinale,
- essai d'autres types de défauts de l'ADN.

Ces essais fournissent des preuves plus ou moins indirectes. Leurs résultats positifs doivent normalement être étayés par des résultats positifs tirés d'essais *in vivo* de mutagénicité sur cellules somatiques, chez des mammifères ou chez l'homme [voir catégorie 3, de préférence des méthodes telles que celles du point 3 (a)].

##### 2 (c)

Essais *in vivo* montrant des effets mutagènes dans les cellules somatiques de mammifères [voir point 3 (a)], en combinaison avec des méthodes toxicocinétiques ou d'autres méthodologies pouvant démontrer que le composé ou un métabolite significatif atteint les cellules germinales.

Pour les méthodes 2 (b) et 2 (c), des résultats positifs d'essais avec hôte intermédiaire (host-mediated) ou la démonstration d'effets irréfutables lors d'essais *in vitro* peuvent être considérés comme preuves supplémentaires.

### Catégorie 3

Pour classer une substance dans la catégorie 3, il faut détenir des résultats positifs tirés d'essais montrant : a) des effets mutagènes ou b) une autre interaction cellulaire en rapport avec la mutagénicité, dans les cellules somatiques de mammifères in vivo. Cette dernière surtout doit normalement être étayée par des résultats positifs tirés d'essais de mutagénicité réalisés in vitro.

En ce qui concerne les effets dans les cellules somatiques in vivo, on considère actuellement comme appropriées les méthodes ci-après :

#### 3 (a) Essais in vivo de mutagénicité sur des cellules somatiques :

- essais du micronoyau sur cellule de moelle osseuse ou analyse des métaphases,
- analyse des métaphases de lymphocytes périphériques,
- essai de taches colorées sur le pelage de souris (spot-test).

#### 3 (b) Essais in vivo d'interaction avec l'ADN de cellules somatiques :

- essai d'échanges de chromatides sœurs dans des cellules somatiques,
- essai de synthèse non programmée de l'ADN dans des cellules somatiques,
- essai de liaison (covalente) du mutagène à l'ADN de la cellule somatique,
- essai de défauts de l'ADN, par exemple par élution alcaline, dans des cellules somatiques.

Les substances montrant des résultats positifs uniquement dans un ou plusieurs essais de mutagénicité in vitro ne doivent normalement pas être classées. Toutefois, leur étude complémentaire par des essais in vivo est vivement conseillée. Dans des cas exceptionnels, il faut envisager une classification dans la catégorie 3, par exemple pour une substance qui présente des réponses prononcées dans plusieurs essais in vitro, pour laquelle on ne dispose d'aucune information pertinente in vivo et qui présente une ressemblance avec des substances mutagènes/cancérogènes connues.

### 4.2.3. Substances toxiques pour la reproduction

4.2.3.1. En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et vu l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en trois catégories :

#### Catégorie 1 :

##### *Substances connues pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine*

On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à la substance et une altération de la fertilité.

##### *Substances connues pour provoquer des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine*

On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition humaine à la substance et des effets toxiques ultérieurs sur le développement de la descendance.

#### Catégorie 2 :

##### *Substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine*

On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut altérer la fertilité. Cette présomption se fonde sur :

- la mise en évidence nette, dans des études sur l'animal, d'une altération de la fertilité intervenant soit en l'absence d'effets toxiques, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques,
- d'autres informations pertinentes.

##### *Substances devant être assimilées à des substances causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine*

On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition humaine à de telles substances peut entraîner des effets toxiques sur le développement. Cette présomption se fonde généralement sur :

- la mise en évidence nette, dans des études appropriées sur l'animal, d'effets observés soit en l'absence de signes de toxicité maternelle marquée, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui ne sont pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques,
- d'autres informations pertinentes.

#### Catégorie 3

##### *Substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine*

Généralement sur la base :

- de résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte suspicion d'une altération de la fertilité intervenant soit en l'absence d'effets toxiques, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques, ces preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance dans la catégorie 2,
- d'autres informations pertinentes.

##### *Substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement*

Cette présomption est généralement fondée sur :

- les résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte suspicion de toxicité pour le développement soit en l'absence de signes de toxicité maternelle marquée, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques, les preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance dans la catégorie 2,
- d'autres informations appropriées.

### 4.2.3.2. Les symboles et phrases indiquant les risques particuliers ci-après s'appliquent.

#### Catégorie 1 :

Pour les substances qui altèrent la fertilité dans l'espèce humaine :

Les substances classées comme toxiques pour la reproduction de catégorie 1 sont caractérisées par le symbole « T » et la phrase de risque

R60 Peut altérer la fertilité

Pour les substances provoquant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine :

Les substances classées comme toxiques pour la reproduction de catégorie 1 sont caractérisées par le symbole « T » et la phrase de risque

R61 Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

#### Catégorie 2 :

Pour les substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine :

Les substances classées comme toxiques pour la reproduction de catégorie 2 sont caractérisées par le symbole « T » et la phrase de risque

**R60 Peut altérer la fertilité**

Pour les substances devant être assimilées à des substances provoquant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine :

Les substances classées comme toxiques pour la reproduction de catégorie 2 sont caractérisées par le symbole « T » et la phrase de risque

**R61 Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant****Catégorie 3 :**

Pour les substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine :

Les substances classées comme toxiques pour la reproduction de catégorie 3 sont caractérisées par le symbole « Xn » et la phrase de risque

**R62 Risque possible d'altération de la fertilité**

Pour les substances préoccupantes pour l'homme eu égard à des effets toxiques possibles sur le développement :

Les substances classées comme toxiques pour la reproduction de catégorie 3 sont caractérisées par le symbole « Xn » et la phrase de risque

**R63 Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant****4.2.3.3. Commentaires relatifs à la catégorisation des substances toxiques pour la reproduction**

La toxicité pour la reproduction comprend l'altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez l'homme ou la femme et l'induction d'effets néfastes non héréditaires sur la descendance. Elle peut être classée sous deux rubriques principales, à savoir : 1) effets sur la fertilité masculine ou féminine; 2) toxicité pour le développement.

1) Effets sur la fertilité masculine ou féminine : cette catégorie comprend les effets néfastes sur la libido, le comportement sexuel, les différents aspects de la spermatogénèse ou de l'ovogenèse ou sur l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberaient la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à et y compris l'implantation.

2) Toxicité pour le développement : elle est considérée dans son sens le plus large, comprenant tout effet perturbant le développement normal, aussi bien avant qu'après la naissance. Elle englobe tant les effets qui sont induits ou se manifestent avant la naissance que ceux qui se manifestent après la naissance. Cela comprend les effets embryotoxiques/foetotoxiques tels que la réduction du poids corporel, le retard de croissance et de développement, la toxicité pour les organes, la mort, l'avortement, les anomalies structurelles (effets tératogènes), les anomalies fonctionnelles, les anomalies péri- ou postnatales ainsi que l'altération du développement mental ou physique après la naissance, jusqu'à et y compris le développement pubertaire normal.

La classification des produits chimiques comme toxiques pour la reproduction est destinée à être utilisée pour les produits chimiques qui présentent une propriété intrinsèque ou spécifique de produire de tels effets toxiques. Il n'y a pas lieu de classer les produits chimiques comme toxiques pour la reproduction si ces effets interviennent uniquement en tant que conséquence secondaire non spécifique d'autres effets toxiques. Les produits chimiques les plus préoccupants sont ceux qui sont toxiques pour la reproduction à des niveaux d'exposition qui ne donnent pas d'autres signes de toxicité.

La classification d'une substance dans la catégorie 1 pour les effets sur la fertilité et/ou la toxicité pour le développement repose sur des données épidémiologiques. Le classement en catégorie 2 ou 3 s'effectue essentiellement à partir de données animales. Les données d'études *in vitro*, ou d'études sur des œufs aviens, sont considérées comme des « preuves complémentaires » et ne pourraient qu'exceptionnellement autoriser une classification en l'absence de données *in vivo*.

Comme la plupart des autres types d'effet toxique, il est vraisemblable que les substances manifestant une toxicité pour la reproduction auront un seuil sous lequel les effets néfastes ne seraient pas démontrés. Même lorsque des effets nets ont été démontrés dans des études sur l'animal, l'extrapolation à l'homme peut être incertaine du fait des doses administrées, par exemple lorsque des effets se sont manifestés uniquement à des doses élevées, que les toxicocinétiques sont nettement différentes ou que la voie d'administration est inadéquate. Pour ces raisons ou d'autres raisons analogues, il se peut que la classification dans la catégorie 3, voire l'absence de classification, soit justifiée.

L'annexe V du présent arrêté prévoit un essai de limite dans le cas des substances de faible toxicité. Si une dose d'au moins 1 000 mg/kg par voie orale ne produit aucun signe de toxicité pour la reproduction, les études à d'autres doses peuvent être considérées comme inutiles. S'il existe des données d'études effectuées à des doses supérieures à la dose limite précitée, ces données doivent être prises en compte avec les autres informations pertinentes. Dans des circonstances normales, on considère que les effets constatés uniquement à des doses supérieures à la dose limite n'entraînent pas nécessairement une classification comme toxique pour la reproduction.

**EFFETS SUR LA FERTILITE**

Pour la classification d'une substance dans la catégorie 2 en raison d'une altération de la fertilité, il doit normalement exister des preuves manifestes sur une espèce animale, accompagnées de preuves complémentaires sur le mécanisme ou le site d'action, ou sur l'existence d'une analogie chimique avec d'autres agents d'« antifertilité » connus, ou d'autres informations chez l'homme qui permettent de conclure que des effets seraient susceptibles d'être observés chez l'homme. Lorsqu'il existe des études sur une seule espèce, sans autres preuves complémentaires appropriées, la classification dans la catégorie 3 peut alors s'avérer adéquate.

Etant donné que l'altération de la fertilité peut survenir de façon non spécifique et secondairement à une toxicité générale sévère ou en cas d'inanition grave, la classification dans la catégorie 2 doit uniquement s'effectuer lorsqu'il est prouvé qu'il existe un certain degré de spécificité de la toxicité pour le système reproducteur. S'il a été démontré dans des études sur l'animal que l'altération de la fertilité était due à un échec de l'accouplement, la classification dans la catégorie 2 requiert normalement la mise en évidence du mécanisme d'action afin de déterminer si un effet adverse tel qu'une altération du schéma de production hormonale est susceptible de se produire dans l'espèce humaine.



## TOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT

Pour la classification dans la catégorie 2, il doit exister des preuves manifestes d'effets néfastes dans des études correctement menées sur une ou plusieurs espèces. Comme les effets néfastes survenus pendant la grossesse ou en période postnatale peuvent être une conséquence secondaire de la toxicité pour la mère, d'une absorption réduite de nourriture ou d'eau, du stress maternel, du manque de soins maternels, de déficits alimentaires spécifiques, de conditions d'élevage médiocres, d'infections intercurrentes, etc., il importe que les effets observés interviennent dans des études correctement menées et à des doses non associées à une toxicité maternelle marquée. La voie d'exposition est également importante. En particulier, l'injection intrapéritonéale de substance irritante peut provoquer des lésions locales de l'utérus et de son contenu, et les résultats de telles études doivent être interprétés avec prudence et n'entraînent normalement pas à eux seuls une classification.

La classification dans la catégorie 3 se fonde sur des critères similaires à ceux de la catégorie 2, mais elle peut être utilisée lorsque le protocole expérimental présente des défauts qui rendent les conclusions moins convaincantes, ou lorsqu'il est impossible d'exclure que les effets puissent être dus à des facteurs non spécifiques tels qu'une toxicité générale.

En général, la classification en catégorie 3 ou la non-classification est décidée sur une base ad hoc, lorsque les seuls effets enregistrés sont des modifications réduites de l'incidence des défauts spontanés, des proportions des variations courantes observées dans les examens du squelette ou des différences réduites dans l'appréciation du développement postnatal.

### *Effets durant la lactation*

Les substances classées toxiques pour la reproduction sont également préoccupantes en raison de leurs effets sur la lactation; elles doivent également être étiquetées avec la phrase R64 (voir les critères au point 3.2.8).

En ce qui concerne la classification, les effets toxiques sur la descendance résultant uniquement de l'exposition via le lait maternel ou les effets toxiques résultant de l'exposition directe des enfants ne seront pas considérés comme « toxiques pour la reproduction », sauf si ces effets entraînent une altération du développement de la descendance.

Les substances non classées toxiques pour la reproduction, mais préoccupantes en raison de leur toxicité une fois transmises au nourrisson au cours de la période d'allaitement, doivent être étiquetées avec la phrase R64 (voir les critères au point 3.2.8). Cette phrase R peut également s'avérer appropriée pour les substances qui affectent la quantité ou la qualité du lait.

La phrase R64 doit normalement être attribuée sur la base :

(a) d'études toxicocinétiques qui indiquent la présence probable dans le lait de la substance à des niveaux potentiellement toxiques et/ou

(b) sur la base de résultats d'études sur une ou deux générations chez l'animal, qui indiquent la présence d'effets néfastes sur la descendance en raison du passage dans le lait, et/ou

(c) sur la base de preuves chez l'homme indiquant un risque pour les nourrissons pendant la période d'allaitement.

Les substances dont on sait qu'elles s'accumulent dans l'organisme et pourraient être ensuite libérées dans le lait au cours de la lactation peuvent être étiquetées avec les phrases R33 et R64.

### 4.2.4. Procédure de classification des préparations en ce qui concerne les effets spécifiques sur la santé

Si une préparation contient une ou plusieurs substances classées en fonction des critères détaillés ci-dessus, elle doit être classée conformément aux critères visés à l'annexe I<sup>o</sup>, partie B, parties 1.7 à 1.9 et partie 2.6 de l'AR du 11 janvier 1993 (les limites de concentration se trouvent soit à l'annexe I du présent arrêté, soit à l'annexe I, partie B, partie 2.6 de l'AR du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances considérées ne figurent pas à l'annexe I<sup>o</sup> ou y figurent sans limites de concentration).

## 5. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT

### 5.1. Introduction

La classification des substances et préparations dangereuses pour l'environnement vise principalement à avertir l'utilisateur des risques que ces substances et préparations présentent pour les écosystèmes. Même si les critères actuels se réfèrent largement aux écosystèmes aquatiques, il est reconnu que certaines substances et préparations peuvent simultanément ou alternativement affecter d'autres écosystèmes dont les éléments peuvent aller de la microflore et de la microfaune du sol aux primates.

Les critères indiqués ci-après proviennent directement des méthodes d'essai citées à l'annexe V dans la mesure où elles sont mentionnées. Les méthodes d'essai requises pour le « dossier de base », citées à l'annexe VII, sont limitées et les informations qui en sont dérivées peuvent se révéler insuffisantes pour établir une classification appropriée. La classification peut exiger des données complémentaires provenant du niveau 1 (annexe VIII) ou d'autres études équivalentes. En outre, les substances classées peuvent faire l'objet d'une révision à la lumière de données nouvelles.

En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et eu égard à l'état actuel des connaissances, ces substances et préparations sont divisées en deux groupes, soit en fonction de leurs effets aigus et/ou à long terme dans les systèmes aquatiques, soit en fonction de leurs effets aigus et/ou à long terme dans les systèmes non aquatiques.

5.1.1. La classification des substances s'effectue généralement sur la base des données expérimentales relatives à la toxicité aiguë pour les systèmes aquatiques, à la dégradation, et au  $\log_{Po/e}$  (ou au BCF si disponible).

5.1.2. La classification des préparations s'effectue normalement à partir des résultats obtenus par une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 3 et à l'annexe I, partie C, parties 1 et 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993. Dans ce cas, la classification est fondée sur les limites de concentration individuelles figurant

— à l'annexe I<sup>o</sup> du présent arrêté;

— à l'annexe I<sup>o</sup>, partie C, partie 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances ne figurent pas à l'annexe I du présent arrêté ou y figurent sans limite de concentration.

5.1.3. En règle générale, la classification d'une préparation repose sur l'application d'une méthode conventionnelle. Cependant, pour la détermination de la toxicité aiguë pour les systèmes aquatiques, il peut dans certains cas s'avérer utile d'effectuer des essais sur la préparation. Les résultats de ces essais peuvent uniquement être utilisés pour modifier la classification en ce qui concerne la toxicité aiguë pour les systèmes aquatiques, qui aurait été obtenue en appliquant une méthode conventionnelle. Si le responsable de la mise sur le marché choisit de recourir à de tels essais, il convient de s'assurer que les critères de qualité des méthodes d'essai visées à la partie C de l'annexe V du présent arrêté ont été respectés. Les essais doivent en outre être réalisés sur les trois groupes d'espèces, conformément aux critères énoncés dans la présente annexe (algues, daphnies et poissons), sauf si après réalisation d'essais sur l'une des espèces, la préparation a été classée dans la catégorie correspondant au risque le plus élevé en ce qui concerne la toxicité aiguë pour les systèmes aquatiques, ou si des résultats d'essai étaient déjà disponibles avant l'entrée en vigueur de la directive 1999/45/CE.



**5.2. Critères de classification, indication de danger et choix des phrases indiquant les risques**

Les critères de classification des substances visés au point 5.2.1 ne s'appliquent aux préparations que si ces dernières ont été testées conformément aux dispositions du point 5.1.3.

**5.2.1. Environnement aquatique**

5.2.1.1. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole « N », l'indication de danger appropriée et des phrases de risque compte tenu des critères suivants :

R50 Très toxique pour les organismes aquatiques, et

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Toxicité aiguë :	96 h CL <sub>50</sub> (poisson)	≤ 1 mg/l
	ou	48 h CE <sub>50</sub> (daphnie)
	ou	72 h IC <sub>50</sub> (algues)

et

— la substance ne se dégrade pas facilement,

ou

— le  $\log_{Po/e}$  (expression logarithmique du coefficient de partage octanol/eau)  $\geq 3,0$  (sauf si le BCF déterminé expérimentalement  $\leq 100$ ) (BCF = Facteur de bioconcentration)

R50 Très toxique pour les organismes aquatiques

Toxicité aiguë :	96 h CL <sub>50</sub> (poisson)	≤ 1 mg/l
	ou	48 h CE <sub>50</sub> (daphnie)
	ou	72 h CI <sub>50</sub> (algues)

R51 Toxique pour les organismes aquatiques, et

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Toxicité aiguë :	96 h CL <sub>50</sub> (poisson)	1 mg/l < CL <sub>50</sub> ≤ 10 mg/l
	ou	48 h CE <sub>50</sub> (daphnie)
	ou	72 h CI <sub>50</sub> (algues)

et

— la substance ne se dégrade pas facilement,

ou

— le  $\log_{Po/e} \geq 3,0$  (sauf si le BCF déterminé expérimentalement  $\leq 100$ ).

5.2.1.2. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer des phrases de risque compte tenu des critères suivants :

R52 Nocif pour les organismes aquatiques, et

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Toxicité aiguë :	96 h CL <sub>50</sub> (poisson)	10 mg/l < CL <sub>50</sub> ≤ 100 mg/l
	ou	48 h CE <sub>50</sub> (daphnie)
	ou	72 h CI <sub>50</sub> (algues)

et

la substance ne se dégrade pas facilement.

Ce critère s'applique sauf s'il existe des preuves scientifiques supplémentaires concernant la dégradation et/ou la toxicité, suffisantes pour fournir une preuve adéquate que ni la substance ni les produits de sa dégradation ne constitueront un danger potentiel à long terme et/ou différé pour l'environnement aquatique. Ces preuves scientifiques supplémentaires doivent normalement se fonder sur les études requises au niveau 1 (annexe VIII) ou sur des études équivalentes et peuvent comprendre :

(i) un potentiel établi de dégradation rapide dans l'environnement aquatique;

(ii) une absence d'effets toxiques chroniques à une concentration de 1,0 mg/l, par exemple une concentration sans effet observé supérieure à 1,0 mg/l déterminée lors d'une étude prolongée de toxicité avec le poisson ou la daphnie.

R52 Nocif pour les organismes aquatiques

Substances qui n'entrent pas dans les critères repris ci-dessus dans le présent chapitre, mais qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leur toxicité, pourraient néanmoins présenter un danger pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes aquatiques.

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Substances qui n'entrent pas dans les critères repris ci-dessus dans le présent chapitre, mais qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leur persistance, leur potentiel d'accumulation ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement pourraient néanmoins présenter un danger à long terme et/ou différé pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes aquatiques.

Par exemple, les substances peu solubles dans l'eau, c'est-à-dire dont la solubilité est inférieure à 1 mg/l, seront visées par ce critère si :

(a) elles ne se dégradent pas facilement et

(b) le  $\log_{Po/e} \geq 3,0$  (sauf si le BCF déterminé expérimentalement  $\leq 100$ ).

Ce critère s'applique aux substances sauf s'il existe des preuves scientifiques supplémentaires concernant la dégradation et/ou la toxicité, suffisantes pour fournir une garantie adéquate que ni la substance ni les produits de sa dégradation ne constitueront un danger potentiel à long terme et/ou différé pour l'environnement aquatique.

Ces preuves scientifiques supplémentaires doivent normalement se fonder sur les études requises au niveau 1 (annexe VIII) ou sur des études équivalentes et peuvent comprendre :

- (i) un potentiel établi de dégradation rapide dans l'environnement aquatique;
- (ii) une absence d'effets toxiques chroniques à la limite de solubilité, par exemple une concentration sans effet observé supérieure à une limite de solubilité déterminée lors d'une étude prolongée de toxicité avec le poisson ou la daphnie.

#### 5.2.1.3. Commentaires relatifs à la détermination de $CI_{50}$ pour les algues et de la dégradabilité

— Lorsque l'on peut démontrer, dans le cas de substances fortement colorées, que la croissance des algues est inhibée seulement par une réduction de l'intensité lumineuse, la 72 h  $CI_{50}$  pour les algues ne doit pas servir de base pour la classification.

— Les substances sont considérées comme se dégradant facilement si les critères suivants sont vérifiés :

- (a) si, lors d'études de biodégradation sur 28 jours, les niveaux de dégradation ci-après sont atteints :
  - lors d'essais basés sur le carbone organique dissous : 70 %,
  - lors d'essais basés sur la déperdition d'oxygène ou la production de gaz carbonique : 60 % des maximums théoriques.

Ces niveaux de biodégradation doivent être atteints dix jours après le commencement de la dégradation, ce point étant pris comme le moment où 10 % de la substance se sont dégradés;

ou

(b) dans les cas où l'on dispose uniquement de données DCO et DBO<sub>5</sub>, lorsque le rapport DBO<sub>5</sub>/DCO est supérieur ou égal à 0,5;

ou

(c) si l'on dispose d'autres preuves scientifiques convaincantes pour démontrer que la substance peut se dégrader (biotiquement et/ou abiotiquement) dans l'environnement aquatique jusqu'à un niveau supérieur à 70 % sur une période de 28 jours.

#### 5.2.2. Environnement non aquatique

5.2.2.1. Les substances et préparations seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole « N », l'indication de danger appropriée et les phrases de risque correspondantes compte tenu des critères suivants :

- R54 Toxique pour la flore
- R55 Toxique pour la faune
- R56 Toxique pour les organismes du sol
- R57 Toxique pour les abeilles
- R58 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement

Substances et préparations qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leurs propriétés, persistance, potentiel d'accumulation ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger immédiat ou à long terme et/ou différé pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes naturels autres que ceux visés au point 5.2.1 ci-dessus. Des critères détaillés seront élaborés ultérieurement.

5.2.2.2. Les substances et préparations seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole « N », l'indication de danger appropriée, le cas échéant, et les phrases de risque correspondantes compte tenu des critères suivants :

- R59 Dangereux pour la couche d'ozone

Substances qui sur la base d'éléments disponibles concernant leurs propriétés ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger pour la structure et/ou le fonctionnement de la couche d'ozone stratosphérique. Cette catégorie inclut les substances figurant à l'annexe I du règlement (CE) n° 2037/2000 du Parlement européen et du Conseil relatif aux substances qui détruisent la couche d'ozone (JO L244 du 29.9.2000, p. 1) et dans ses modifications ultérieures.

Les préparations sont classées sur la base d'une méthode conventionnelle visée à l'article 5, § 3 et à l'annexe I<sup>re</sup>, partie C, parties 1 et 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

### 6. CHOIX DES CONSEILS DE PRUDENCE

#### 6.1. Introduction

Les conseils de prudence (phrases S) sont attribués aux substances et préparations dangereuses conformément aux critères généraux ci-après. En outre, pour certaines préparations, les conseils de prudence qui figurent à l'annexe II de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 sont obligatoires.

Chaque fois que le fabricant est mentionné au point 6, cela se réfère au responsable de la mise sur le marché de la substance ou de la préparation.

#### 6.2. Conseils de prudence pour les substances et les préparations

##### S1 Conserver sous clé

— Applicabilité :

— substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations précitées si elles sont vendues au grand public.

##### S2 Conserver hors de la portée des enfants

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations dangereuses.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour toutes les substances et préparations dangereuses vendues au grand public, à l'exception de celles uniquement classées comme dangereuses pour l'environnement.

##### S3 Conserver dans un endroit frais

— Applicabilité :

— peroxydes organiques,

— autres substances et préparations dangereuses dont le point d'ébullition est inférieur ou égal à 40 °C.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les peroxydes organiques sauf si la phrase S47 est utilisée,

— recommandé pour les autres substances et préparations dangereuses dont le point d'ébullition est inférieur ou égal à 40 °C.

**S4 Conserver à l'écart de tout local d'habitation**

— Applicabilité :

— substances et préparations très toxiques et toxiques.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux substances et préparations très toxiques et toxiques lorsqu'il est souhaitable de compléter la phrase S13 (lorsqu'il y a par exemple un risque d'inhalation et que ces substances ou préparations doivent être entreposées à l'écart de tout local d'habitation). Ce conseil ne vise pas à exclure l'utilisation adéquate de ces substances ou préparations dans des locaux d'habitation.

**S5 Conserver sous... (liquide approprié à spécifier par le fabricant)**

— Applicabilité :

— substances et préparations solides spontanément inflammables.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux cas spéciaux tels que le sodium, le potassium ou le phosphore blanc.

**S6 Conserver sous... (gaz inerte à spécifier par le fabricant)**

— Applicabilité :

— substances et préparations dangereuses qui doivent être conservées en atmosphère inerte.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux cas spéciaux tels que certains composés organométalliques.

**S7 Conserver le récipient bien fermé**

— Applicabilité :

— peroxydes organiques.

— substances et préparations pouvant donner lieu à des dégagements de gaz très toxiques, toxiques, nocifs, ou extrêmement inflammables,

— substances et préparations qui, en contact avec l'humidité, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,

— solides facilement inflammables.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les peroxydes organiques,

— recommandé pour les autres domaines d'application précités.

**S8 Conserver le récipient à l'abri de l'humidité**

— Applicabilité :

— substances et préparations pouvant réagir violemment avec l'eau,

— substances et préparations qui, en contact avec l'eau, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,

— substances et préparations qui, en contact avec l'eau, donnent lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux domaines d'application précités lorsqu'il est nécessaire de renforcer les avertissements donnés par les phrases R14 et R15, en particulier, et R29.

**S9 Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé**

— Applicabilité :

— substances et préparations volatiles pouvant donner lieu à des dégagements de vapeurs très toxiques, toxiques ou nocives,

— liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables et gaz extrêmement inflammables.

— Critères d'utilisation :

— recommandé pour les substances et préparations volatiles pouvant donner lieu à des dégagements de vapeurs très toxiques, toxiques ou nocives,

— recommandé pour les liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables ou les gaz extrêmement inflammables.

**S12 Ne pas fermer hermétiquement le récipient**

— Applicabilité :

— substances et préparations susceptibles de faire éclater leur récipient par dégagement de gaz ou de vapeurs.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux cas spéciaux précités.

**S13 Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux**

— Applicabilité :

— substances et préparations très toxiques, toxiques et nocives.

— Critères d'utilisation :

— recommandé lorsque de telles substances ou préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

**S14 Conserver à l'écart des... (matières incompatibles à indiquer par le fabricant)**

— Applicabilité :

— peroxydes organiques.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les peroxydes organiques et limité normalement à ceux-ci. Peut toutefois être utile dans certains cas exceptionnels, lorsqu'une incompatibilité est susceptible d'entraîner un risque particulier.

**S15 Conserver à l'écart de la chaleur**

— Applicabilité :

— substances et préparations susceptibles de se décomposer ou de réagir spontanément sous l'effet de la chaleur.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux cas spéciaux, tels que les monomères, mais non attribué si les phrases R2, R3 et/ou R5 sont déjà utilisées.

*S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer*

— Applicabilité :

— liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables et gaz extrêmement inflammables.

— Critères d'utilisation :

— recommandé pour les substances et préparations précitées mais non attribué si les phrases R2, R3 et/ou R5 sont déjà utilisées.

*S17 Tenir à l'écart des matières combustibles*

— Applicabilité :

— substances et préparations pouvant constituer des mélanges explosibles ou spontanément inflammables avec des matières combustibles.

— Critères d'utilisation :

— à utiliser dans des cas spéciaux (pour insister sur les phrases R8 et R9, par exemple).

*S18 Manipuler et ouvrir le récipient avec prudence*

— Applicabilité :

— substances et préparations pouvant engendrer une surpression dans le récipient,

— substances et préparations pouvant entraîner la formation de peroxydes explosifs. — Critères d'utilisation :

— limité normalement aux cas précités lorsqu'il y a un risque de lésions oculaires et/ou lorsque ces substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

*S20 Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation*

— Applicabilité :

— substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement aux cas spéciaux (par exemple l'arsenic et les composés d'arsenic, les fluoro-acétates), notamment lorsque ces produits sont susceptibles d'être utilisés par le grand public.

*S21 Ne pas fumer pendant l'utilisation*

— Applicabilité :

— substances et préparations dont la combustion dégage des produits toxiques.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement à des cas spéciaux (composés halogénés, par exemple).

*S22 Ne pas respirer les poussières*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations solides dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations précitées auxquelles la phrase R42 est attribuée,

— recommandé pour les substances et préparations mentionnées ci-dessus vendues sous forme de poussières inhalables et pour lesquelles les dangers pour la santé consécutifs à une inhalation ne sont pas connus.

*S23 Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant]*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations, liquides ou gazeuses, dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations précitées auxquelles la phrase R42 est attribuée,

— obligatoire pour les substances et préparations qui sont destinées à être utilisées par pulvérisation. La phrase S38 ou S51 doit également être attribuée,

— recommandé lorsqu'il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques d'inhalation non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances.

*S24 Éviter le contact avec la peau*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R43 a été attribuée, sauf si la phrase S36 a aussi été attribuée,

— recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec la peau, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances (par exemple parésie). Cette mention peut cependant être utilisée pour souligner de telles phrases.

*S25 Éviter le contact avec les yeux*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

— recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec les yeux, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées. Cette mention peut cependant être utilisée pour souligner de telles phrases.

— recommandé pour les substances auxquelles sont attribuées les phrases R34, R35, R36 ou R41 et qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

*S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste*

— Applicabilité :

— substances et préparations corrosives ou irritantes.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations corrosives ainsi que pour les substances et préparations auxquelles la phrase de risque R41 a été attribuée,

— recommandé pour les substances et préparations irritantes auxquelles la phrase de risque R36 a été attribuée.

*S27 Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé*

— Applicabilité :

— substances et préparations très toxiques, toxiques ou corrosives.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations très toxiques auxquelles la phrase R27 a été attribuée et qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public,

— recommandé pour les substances et préparations très toxiques auxquelles la phrase R27 a été attribuée, et qui sont utilisées dans l'industrie. Ce conseil de prudence ne doit toutefois pas être utilisé si la phrase S36 a été attribuée,

— recommandé pour les substances et préparations toxiques auxquelles la phrase R24 a été attribuée, ainsi que pour les substances et préparations corrosives qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

*S28 Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec... (produits appropriés à indiquer par le fabricant)*

— Applicabilité :

— substances et préparations très toxiques, toxiques ou corrosives.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations très toxiques,

— recommandé pour les autres substances et préparations précitées, en particulier lorsque l'eau ne constitue pas le liquide de rinçage le plus indiqué,

— recommandé pour les substances et préparations corrosives qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

*S29 Ne pas jeter les résidus à l'égout*

— Applicabilité :

— liquides extrêmement ou facilement inflammables non miscibles avec l'eau,

— substances et préparations très toxiques et toxiques,

— substances et préparations dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations dangereuses pour l'environnement et portant le symbole « N » qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public, sauf si c'est l'utilisation prévue,

— recommandé pour les autres substances et préparations précitées qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public sauf si c'est l'utilisation prévue.

*S30 Ne jamais verser de l'eau dans ce produit*

— Applicabilité :

— substances et préparations réagissant violemment avec l'eau.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement à des cas spéciaux (acide sulfurique, par exemple); peut être utilisé, le cas échéant, pour donner l'information la plus claire possible, que ce soit pour souligner la phrase R14 ou comme alternative à cette même phrase R14.

*S33 Eviter l'accumulation de charges électrostatiques*

— Applicabilité :

— substances et préparations extrêmement ou facilement inflammables.

— Critères d'utilisation :

— recommandé pour les substances et préparations utilisées par l'industrie qui n'absorbent pas l'humidité; n'est pratiquement jamais utilisé pour les substances et préparations mises sur le marché à destination du grand public.

*S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations dangereuses.

— Critères d'utilisation :

— recommandé pour les substances et préparations lorsque des instructions spéciales sont nécessaires pour leur élimination correcte.

*S36 Porter un vêtement de protection approprié*

— Applicabilité :

— peroxydes organiques,

— substances et préparations très toxiques, toxiques ou nocives,

— substances et préparations corrosives.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations très toxiques et corrosives,

— obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R21 ou R24 a été attribuée,

— obligatoire pour les substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de la catégorie 3, sauf si les effets se manifestent uniquement en cas d'inhalation de la substance ou préparation,

— obligatoire pour les peroxydes organiques,

— recommandé pour les substances et préparations toxiques lorsque la valeur DL<sub>50</sub> par voie cutanée est inconnue, mais que la substance ou préparation est susceptible d'être toxique par contact avec la peau,

— recommandé pour les substances et préparations utilisées dans l'industrie et qui sont susceptibles d'être nuisibles à la santé en cas d'exposition prolongée.



*S37 Porter des gants appropriés*

- Applicabilité :
- substances et préparations très toxiques, toxiques, nocives ou corrosives,
- peroxydes organiques,
- substances et préparations irritantes pour la peau, ou provoquant une sensibilisation par contact cutané.
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations très toxiques et corrosives,
- obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R21, R24 ou R43 a été attribuée,
- obligatoire pour les substances cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de la catégorie 3 sauf si les effets se manifestent uniquement en cas d'inhalation de la substance ou de la préparation,
- obligatoire pour les peroxydes organiques,
- recommandé pour les substances et préparations toxiques lorsque la valeur DL<sub>50</sub> par voie cutanée est inconnue, mais que la substance ou préparation est susceptible d'être nocive par contact avec la peau,
- recommandé pour les substances et préparations irritantes pour la peau.

*S38 En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié*

- Applicabilité :
- substances et préparations très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement aux cas spéciaux où des substances et préparations très toxiques ou toxiques sont utilisées dans l'industrie ou l'agriculture.

*S39 Porter un appareil de protection des yeux/du visage*

- Applicabilité :
- peroxydes organiques,
- substances et préparations corrosives y compris les irritants susceptibles de provoquer de graves lésions oculaires,
- substances et préparations très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R34, R35 ou R41 a été attribuée,
- obligatoire pour les peroxydes organiques,
- recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec les yeux, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées,
- limité normalement aux cas exceptionnels où sont utilisées des substances et préparations très toxiques et toxiques, lorsqu'il peut y avoir des éclaboussures et que ces substances et préparations sont susceptibles d'être facilement absorbées par la peau.

*S40 Pour nettoyer le sol ou les objets souillés par ce produit, utiliser... (à préciser par le fabricant)*

- Applicabilité :
- toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement aux substances et préparations dangereuses pour lesquelles l'eau n'est pas considérée comme un agent nettoyant adéquat (lorsqu'il faut recourir à l'absorption par un matériau pulvérulent, à une dissolution par un solvant, etc.) et au cas où il est important, pour des raisons sanitaires ou pour des raisons de sécurité, de faire figurer un avertissement sur l'étiquette.

*S41 En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées*

- Applicabilité :
- substances et préparations dangereuses dont la combustion donne lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement à des cas spéciaux.

*S42 Pendant les fumigations/pulvérisations, porter un appareil respiratoire approprié [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant]*

- Applicabilité :
- substances et préparations destinées à cet usage, mais susceptibles de compromettre la santé et la sécurité de l'utilisateur si des mesures de précaution ne sont pas prises.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement à des cas spéciaux.

*S43 En cas d'incendie, utiliser... (moyens d'extinction à préciser par le fabricant; si l'eau augmente les risques, ajouter : « Ne jamais utiliser d'eau »)*

- Applicabilité :
- substances et préparations extrêmement inflammables, facilement inflammables et inflammables.
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations qui, en contact avec l'eau ou avec l'air humide, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,
- recommandé pour les substances et préparations extrêmement inflammables, facilement inflammables et inflammables, particulièrement lorsqu'elles ne se mélangent pas à l'eau.

*S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)*

- Applicabilité :
- substances et préparations très toxiques,
- substances et préparations toxiques et corrosives,
- substances et préparations provoquant une sensibilisation par inhalation.
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations précitées.



S46 *En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations dangereuses autres que celles qui sont très toxiques, toxiques, corrosives ou dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour toutes les substances et préparations dangereuses précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, sauf si l'ingestion de ces produits, particulièrement par des enfants, peut être considérée comme inoffensive.

S47 *Conserver à une température ne dépassant pas... ° C (à préciser par le fabricant)*

— Applicabilité :

— substances et préparations devenant instables à une certaine température.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement à des cas spéciaux (certains peroxydes organiques, par exemple).

S48 *Maintenir humide avec... (moyen approprié à préciser par le fabricant)*

— Applicabilité :

— substances et préparations pouvant devenir très sensibles aux étincelles, au frottement ou au choc si on les laisse se dessécher.

— Critères d'utilisation :

— limité normalement à des cas spéciaux, tels que les nitrocelluloses.

S49 *Conserver uniquement dans le récipient d'origine*

— Applicabilité :

— substances et préparations sensibles à la décomposition catalytique.

— Critères d'utilisation :

— substances et préparations sensibles à la décomposition catalytique (par exemple certains peroxydes organiques).

S50 *Ne pas mélanger avec... (à spécifier par le fabricant)*

— Applicabilité :

— substances et préparations pouvant réagir avec le produit spécifié et donner lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques,

— peroxydes organiques.

— Critères d'utilisation :

— recommandé pour les substances et préparations précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, lorsque cette mention est préférable aux phrases R31 ou R32,

— obligatoire avec certains peroxydes pouvant donner lieu à des réactions violentes en présence d'accélérateurs ou de promoteurs.

S51 *Utiliser seulement dans des zones bien ventilées*

— Applicabilité :

— substances et préparations pouvant ou devant donner lieu à des dégagements de vapeurs, de poussières, d'aérosols, de fumées, de brouillards, etc., faisant courir des risques par inhalation ou des risques d'incendie ou d'explosion.

— Critères d'utilisation :

— recommandé lorsque la phrase S38 n'est pas indiquée. L'emploi de cette mention est donc important lorsque de telles substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S52 *Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités*

— Applicabilité :

— substances volatiles très toxiques, toxiques et nocives et préparations les contenant.

— Critères d'utilisation :

— recommandé lorsque la santé peut être affectée par une exposition prolongée à ces substances et préparations à cause de leur volatilisation à partir de grandes surfaces traitées dans les logements ou autres endroits clos où des personnes se réunissent.

S53 *Eviter l'exposition - Se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation*

— Applicabilité :

— substances et préparations cancérigènes, mutagènes et/ou toxiques pour la reproduction.

— Critères d'utilisation :

— obligatoire pour les substances et préparations précitées auxquelles a été attribuée au moins une des phrases R suivantes : R45, R46, R49, R60 ou R61.

S56 *Éliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux*

— Applicabilité :

— toutes les substances et préparations dangereuses.

— Critères d'utilisation :

— recommandé pour toutes les substances et préparations dangereuses susceptibles d'être utilisées par le grand public, et pour lesquelles une élimination spéciale est requise.

S57 *Utiliser un récipient approprié pour éviter toute contamination du milieu ambiant*

— Applicabilité :

— substances et préparations auxquelles a été attribué le symbole « N ».

— Critères d'utilisation :

— normalement limité aux substances et préparations qui ne sont pas susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S59 *Consulter le fabricant/fournisseur pour les informations relatives à la récupération/au recyclage*

- Applicabilité :
- toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations dangereuses pour la couche d'ozone,
- recommandé pour les autres substances et préparations pour lesquelles la récupération/le recyclage sont recommandés.

S60 *Éliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux*

- Applicabilité :
- toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation :
- recommandé pour les substances et préparations non susceptibles d'être utilisées par le grand public, lorsque la phrase S35 n'a pas été attribuée.

S61 *Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité*

- Applicabilité :
- substances et préparations dangereuses pour l'environnement.
- Critères d'utilisation :
- normalement utilisé pour les substances et préparations auxquelles a été attribué le symbole « N »,
- recommandé pour toutes les substances et préparations classées comme dangereuses pour l'environnement non visées ci-dessus.

S62 *En cas d'ingestion, ne pas faire vomir. Consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette*

- Applicabilité :
- substances et préparations classées nocives avec la phrase R65 conformément aux critères énoncés au point 3.2.3,
- non applicable aux substances et préparations placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation (voir points 8 et 9).
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations précitées si elles sont vendues au grand public ou susceptibles d'être utilisées par celui-ci, sauf si les phrases S45 ou S46 sont obligatoires,
- recommandé pour les substances et préparations précitées utilisées dans l'industrie, sauf si les phrases S45 ou S46 sont obligatoires.

S63 *En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos*

- Applicabilité :
- substances et préparations très toxiques et toxiques (gaz, vapeurs, particules, liquides volatils),
- substances et préparations provoquant une sensibilisation respiratoire.
- Critères d'utilisation :
- obligatoire pour les substances et préparations auxquelles les phrases R26, R23 ou R42 ont été attribuées et qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public dans des conditions où il y aurait risque d'inhalation.

S64 *En cas d'ingestion, rincer la bouche avec de l'eau (seulement si la personne est consciente)*

- Applicabilité :
- substances et préparations corrosives ou irritantes.
- Critères d'utilisation :
- recommandé pour les substances et préparations précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, et si le traitement indiqué ci-dessus est adapté.

## 7. ETIQUETAGE

7.1. Après détermination de la classification d'une substance ou d'une préparation, l'étiquette appropriée est établie en se référant aux prescriptions de l'article 8, § 1<sup>er</sup> du présent arrêté, pour les substances, et aux dispositions de l'article 9 de l'AR du 11 janvier 1993, pour les préparations. Le présent point explique le mode de détermination de l'étiquette et fournit en particulier une orientation sur le mode de sélection des phrases de risque et des conseils de prudence.

L'étiquette porte les indications suivantes :

- (a) pour les préparations, le nom commercial ou la désignation;
- (b) pour les substances, le nom de la substance, et pour les préparations, les noms des substances présentes dans la préparation, conformément aux règles énoncées à l'article 9, paragraphe 2, point 2.3., de l'arrêté royal du 11 janvier 1993;
- (c) les nom, adresse complète et numéro de téléphone de la personne responsable de la mise sur le marché de la substance ou préparation, qu'il s'agisse du fabricant, de l'importateur ou du distributeur;
- (d) le(s) symbole(s) et indication(s) de danger;
- (e) les phrases indiquant les risques particuliers (phrases R);
- (f) les phrases indiquant les conseils de prudence (phrases S);
- (g) pour les substances, le numéro CE accompagné, dans le cas des substances figurant à l'annexe I<sup>re</sup>, de la mention « étiquetage CE »;
- (h) pour les préparations offertes ou vendues au grand public, la quantité nominale du contenu, sauf si elle est spécifiée ailleurs sur l'emballage.

### Remarque

Pour certaines préparations, des exigences supplémentaires d'étiquetage sont spécifiées à l'article 9, paragraphe 1<sup>er</sup>, point 1.2, et à l'annexe II de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, ainsi qu'à l'article 40 de l'arrêté royal du 5 septembre 2001.

### 7.1.1. Choix final des phrases de risque et des conseils de prudence

Bien que le choix final des phrases R et S les plus adéquates soit régi, en premier lieu, par la nécessité de fournir toutes les informations indispensables, il convient également de tenir compte de la clarté et de l'impact de l'étiquette. Par souci de clarté, l'information nécessaire devrait être exprimée en un nombre minimal de phrases.

Dans le cas de substances irritantes, facilement inflammables, inflammables et comburantes, il n'est pas nécessaire de rappeler les phrases R et S si le contenu de l'emballage ne dépasse pas 125 ml. Il en est de même pour les substances nocives, de même volume, qui ne sont pas vendues au détail au grand public.

Dans le cas des préparations, si le contenu de l'emballage ne dépasse pas 125 ml :

— pour les préparations classées comme facilement inflammables, comburantes, irritantes, à l'exception de celles affectées de la phrase R 41, ou dangereuses pour l'environnement et affectées du symbole « N », il n'est pas nécessaire d'indiquer les phrases R ou les phrases S,

— pour les préparations classées comme inflammables ou dangereuses pour l'environnement et non affectées du symbole « N », il est nécessaire d'indiquer les phrases R, mais pas les phrases S.

7.1.2. Sans préjudice des dispositions de l'article 45 de l'arrêté royal du 28 février 1994 et des dispositions de l'AR du 5 septembre 2001, les indications telles que « non toxique », « non nocif », « non polluant », « écologique » ou toute autre indication tendant à démontrer le caractère non dangereux d'une substance ou d'une préparation, ou susceptible d'entraîner une sous-estimation des dangers de cette substance ou préparation, ne doivent pas figurer sur l'étiquette ou sur l'emballage des substances ou des préparations relevant du présent arrêté ou de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

### 7.2. Nom(s) chimique(s) à faire figurer sur l'étiquette

7.2.1. Pour les substances reprises à l'annexe I<sup>re</sup>, l'étiquette doit porter le nom des substances sous une des dénominations qui figurent à l'annexe I<sup>re</sup>.

Pour les substances non reprises à l'annexe I<sup>re</sup>, le nom est donné en utilisant une nomenclature chimique internationalement reconnue, telle qu'elle est définie au point 1.4.

7.2.2. Pour les préparations, le choix des noms à faire figurer sur l'étiquette est régi par les règles fixées à l'article 9, paragraphe 2, point 2.3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

Remarque :

Sous réserve des dispositions de l'annexe II, point B9 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 :

— le nom de la substance sensibilisante doit être choisi en accord avec les dispositions du point 7.2.1 de la présente annexe,

— dans le cas des préparations concentrées destinées à l'industrie du parfum :

— la personne responsable de leur mise sur le marché peut simplement identifier la substance sensibilisante qu'elle considère comme principalement responsable du risque de sensibilisation,

— dans le cas d'une substance naturelle, le nom chimique peut être du type « huile essentielle de... », « extrait de... », plutôt que le nom des constituants de cette huile essentielle ou de cet extrait.

### 7.3. Choix des symboles de danger

Le dessin des symboles de danger et le libellé des indications de danger doivent être conformes à ceux de l'annexe II. Le symbole est imprimé en noir sur fond jaune orangé.

7.3.1. Pour les substances reprises à l'annexe I<sup>re</sup>, les symboles et indications de danger sont ceux indiqués à l'annexe.

7.3.2. Pour les substances dangereuses qui ne sont pas encore reprises à l'annexe I et pour les préparations, les symboles et indications de danger sont attribués selon les règles établies dans la présente annexe.

Lorsque plus d'un symbole de danger est attribué à une substance ou préparation :

— l'obligation d'apposer le symbole « E » rend facultatif les symboles « F », « F+ » et « O »,

— l'obligation d'apposer le symbole « T+ » ou « T » rend facultatifs les symboles « Xn », « Xi » et « C »,

— l'obligation d'apposer le symbole « C » rend facultatifs les symboles « Xn » et « Xi »,

— l'attribution du symbole « Xn » rend le symbole « Xi » facultatif.

### 7.4. Choix des phrases R

Le libellé des phrases R doit être conforme à celui indiqué à l'annexe III.

Les phrases R combinées de l'annexe III doivent être utilisées, le cas échéant.

7.4.1. Pour les substances reprises à l'annexe I<sup>re</sup>, les phrases R sont celles indiquées à l'annexe.

7.4.2. Pour les substances qui ne figurent pas à l'annexe I, les phrases R sont attribuées selon les critères et priorités suivantes :

(a) dans le cas de dangers engendrant des effets sur la santé :

(i) les phrases R correspondant à la catégorie de danger illustrée par un symbole doivent figurer sur l'étiquette;

(ii) les phrases R correspondant aux autres catégories de danger qui ne sont pas illustrées par un symbole conformément à l'article 8, § 1<sup>er</sup>;

(b) dans le cas de dangers dérivant des propriétés physico-chimiques :

— les phrases R correspondant à la catégorie de danger illustrée par un symbole doivent figurer sur l'étiquette;

(c) dans le cas de dangers pour l'environnement :

— la ou les phrases R correspondant à la catégorie « dangereux pour l'environnement » doivent figurer sur l'étiquette.

7.4.3. Pour les préparations, les phrases R seront choisies conformément aux critères et priorités suivants :

a) dans le cas de dangers engendrant des effets sur la santé :

(i) les phrases R qui correspondent à la catégorie de danger illustrée par un symbole. Dans certains cas, les phrases R doivent être adaptées conformément aux tableaux de l'annexe I<sup>re</sup>, partie B, partie 2 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993. Plus spécifiquement, les phrases R du ou des constituants qui justifient le classement de la préparation dans une catégorie de danger doivent figurer sur l'étiquette;

(ii) les phrases R qui correspondent aux autres catégories de danger qui ont été attribuées aux constituants mais qui ne sont pas illustrées par un symbole conformément à l'article 9, paragraphe 2, point 2.4. de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

b) dans le cas de dangers dérivant des propriétés physico-chimiques :

— les critères décrits au point 7.4.3 a) ci-dessus sont applicables, excepté les phrases de risque « extrêmement inflammable » ou « facilement inflammable » qui ne doivent pas être indiquées lorsqu'elles constituent une répétition de la formulation de l'indication de danger, représentée au moyen d'un symbole;

c) dans le cas de dangers pour l'environnement

(i) la ou les phrases R correspondant à la catégorie « dangereux pour l'environnement » doivent figurer sur l'étiquette;

(ii) si la phrase de risque R50 a été attribuée en plus d'une phrase combinée R51/53 ou R52/53 ou de la phrase R53 seule, il y a lieu d'utiliser la phrase de risque combinée R50/53.

En règle générale, s'appliquant aux préparations, un maximum de six phrases R suffira à décrire le risque; à cette fin, les phrases combinées inventoriées à l'annexe III sont considérées comme des phrases uniques. Cependant, lorsque la préparation appartient simultanément à plusieurs catégories de danger, ces phrases types doivent couvrir l'ensemble des risques principaux présentés par la préparation. Dans certains cas, plus de six phrases R peuvent être nécessaires.

#### 7.5. Conseils de prudence

Le libellé des phrases S doit être conforme à celui indiqué à l'annexe IV.

Les phrases S combinées de l'annexe IV doivent être utilisées, le cas échéant.

7.5.1. Pour les substances figurant à l'annexe I, les phrases S sont celles indiquées dans l'annexe. Lorsqu'aucune phrase S n'est indiquée, le fabricant/l'importateur peut ajouter toute(s) phrase(s) S appropriée(s). Pour les substances ne figurant pas à l'annexe I et pour les préparations, le fabricant doit ajouter des phrases S suivant les critères indiqués au chapitre 6 de la présente annexe.

#### 7.5.2. Sélection des conseils de prudence

Le choix final des conseils de prudence (phrases S) doit tenir compte des phrases de risque (phrases R) indiquées sur l'étiquette et de l'utilisation prévue de la substance ou de la préparation :

— en règle générale, un maximum de six phrases S suffira à formuler le conseil de prudence le plus adéquat; à cette fin, les phrases combinées inventoriées à l'annexe IV sont considérées comme des phrases uniques,

— dans le cas des phrases S concernant l'élimination, une phrase S doit être utilisée sauf s'il est évident que l'élimination du produit et de son récipient ne présente aucun danger pour la santé humaine ou l'environnement. En particulier, les conseils relatifs à une élimination en toute sécurité sont importants pour les substances et préparations vendues au grand public,

— certaines phrases R deviennent superflues si l'on opère un choix judicieux de phrases S et inversement; les phrases S donnant des conseils manifestement en rapport avec les phrases R seront reproduites sur l'étiquette uniquement s'il s'agit de mettre particulièrement l'accent sur un avertissement spécifique,

— dans le choix des phrases S, on accordera une attention particulière aux conditions prévues d'utilisation de certaines substances et préparations, par exemple la pulvérisation ou tous autres effets d'aérosols. Les phrases doivent être sélectionnées en fonction de l'utilisation prévue,

— les conseils de prudence S1, S2 et S45 sont obligatoires pour toutes les substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives vendues au grand public,

— les conseils de prudence S2 et S46 sont obligatoires pour toutes les autres substances et préparations dangereuses (à l'exception de celles classées seulement comme dangereuses pour l'environnement) et vendues au grand public.

Si les phrases sélectionnées dans le respect strict des critères énoncés au point 6.2 sont redondantes ou ambiguës, ou si à l'évidence, elles ne sont pas nécessaires dans le cas d'ensembles produit/emballage particuliers, certaines phrases peuvent être supprimées.

#### 7.6. Le numéro CE

Si une substance mentionnée sur l'étiquette est inscrite dans l'Inventaire européen de substances commerciales existantes (Einecs) ou dans la Liste européenne des substances notifiées (Elincs), les numéros Einecs et Elincs de la substance doivent figurer sur l'étiquette. Cette disposition ne s'applique pas aux préparations.

#### 7.7. Dimensions de l'étiquette pour les préparations

Les dimensions de l'étiquette sont les suivantes :

Contenance de l'emballage	Dimensions (en millimètres)
— 3 litres maximum :	au moins 52 x 74, si possible,
— plus de 3 litres et jusqu'à 50 litres :	au moins 74 x 105
— plus de 50 litres et jusqu'à 500 litres :	au moins 105 x 148
— plus de 500 litres :	au moins 148 x 210

Chaque symbole doit occuper au moins un dixième de la surface de l'étiquette et avoir une superficie d'au moins 1 cm<sup>2</sup>. L'étiquette doit être solidement fixée sur une ou plusieurs faces de l'emballage se trouvant directement en contact avec la préparation.

Les informations devant figurer sur l'étiquette doivent se détacher nettement du fond, être de taille suffisante et présenter un espacement suffisant pour être aisément lisibles.

### 8. CAS PARTICULIERS : SUBSTANCES

#### 8.1. Bouteilles de gaz transportables

Pour les bouteilles de gaz transportables, on considère que les prescriptions relatives à l'étiquetage sont respectées lorsqu'elles sont conformes à l'article 8, § 1<sup>er</sup> ou à l'article 8, paragraphe 2, 6°, b.

Toutefois, par dérogation à l'article 8, § 2, 1° et 2°, pour les bouteilles de gaz ayant une capacité en eau inférieure ou égale à 150 litres, il est possible d'utiliser une des alternatives suivantes :

— le format et les dimensions de l'étiquette peuvent respecter les prescriptions de la norme ISO 7225 (édition 1994) relative aux 'Bouteilles à gaz - Etiquettes de risque',

— les informations visées à l'article 8, § 1<sup>er</sup>, 1°, peuvent être fournies sur un disque ou une étiquette durable, solidement fixé sur la bouteille.

## 8.2. Récipients de gaz destinés au propane, au butane ou au gaz de pétrole liquéfié (GPL)

Ces substances sont classées à l'annexe I. Bien que leur classification soit conforme à l'article 1<sup>er</sup>, § 4, elles ne présentent pas de danger pour la santé humaine lorsqu'elles sont placées sur le marché, comme gaz combustibles libérés uniquement en vue de leur combustion, dans des bouteilles fermées rechargées ou dans des cartouches non rechargeables couvertes par la norme EN 417 (EN 417, édition septembre 1992, relative aux 'cartouches métalliques pour gaz de pétrole liquéfiés, non rechargeables, avec ou sans valve, destinées à alimenter des appareils portatifs; construction, contrôle et marquage').

Ces bouteilles et ces cartouches doivent être étiquetées avec le symbole approprié et les phrases R et S concernant l'inflammabilité. Il n'est pas requis d'indiquer sur l'étiquette les informations concernant les effets sur la santé humaine. Cependant ces informations qui auraient dû apparaître sur l'étiquette seront transmises à l'utilisateur professionnel par la personne responsable de la mise sur le marché de la substance, sous la forme prévue à l'article 9, § 2 du présent arrêté. En ce qui concerne les consommateurs, il leur sera transmis suffisamment d'informations pour leur permettre de prendre toutes les mesures nécessaires pour la santé et la sécurité, comme il est prévu à l'article 12, § 2, point 2.3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

## 8.3. Métaux sous forme massive

Ces substances sont classées à l'annexe I<sup>re</sup> ou doivent être classées conformément à l'article 3, § 4. Bien que classées conformément à l'article 1<sup>er</sup>, § 4 certaines de ces substances ne présentent pas, sous leur forme commercialisée, de danger pour la santé humaine en cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau, ni pour l'environnement aquatique. Ces substances ne requièrent pas d'étiquette en vertu de l'article 8, § 1<sup>er</sup>. Cependant, toutes les informations qui auraient dû figurer sur l'étiquette devront être communiquées à l'utilisateur par la personne responsable de la mise sur le marché du métal, sous une forme prévue à l'article 9, § 2.

## 8.4. Substances classées avec la phrase R65

Pour les substances classées nocives en raison du danger en cas d'aspiration, il n'est pas nécessaire de les étiqueter « nocif » avec la phrase R65 si elles sont placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation.

## 9. CAS PARTICULIERS : PREPARATIONS

### 9.1. Préparations gazeuses (mélanges de gaz)

Pour les préparations gazeuses, il faut tenir compte :

- de l'évaluation des propriétés physico-chimiques,
- de l'évaluation des dangers pour la santé,
- de l'évaluation des risques pour l'environnement.

#### 9.1.1. Evaluation des propriétés physico-chimiques

##### 9.1.1.1. Inflammabilité

Les propriétés d'inflammabilité de ces préparations sont déterminées conformément à l'article 5, § 1<sup>er</sup> de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 selon les méthodes spécifiées à l'annexe V du présent arrêté.

Ces préparations seront classées en fonction des résultats des essais effectués et selon les critères de l'annexe V et ceux du guide de classification.

Toutefois, par dérogation, dans le cas où ces préparations gazeuses sont produites sur commande en petites quantités, l'inflammabilité de ces mélanges gazeux peut être évaluée grâce à la méthode de calcul suivante :

L'expression du mélange de gaz :

$$A_1F_1 + \dots + A_iF_i + \dots + A_nF_n + B_1I_1 + \dots + B_iI_i + \dots + B_pI_p$$

où :

$A_i$  et  $B_i$  sont les fractions molaires,

$F_i$  est un gaz inflammable,

$I_i$  est un gaz inerte,

$n$  est le nombre de gaz inflammables,

$p$  est le nombre de gaz inertes,

peut être transformée sous une forme dans laquelle tous les  $I_i$  (gaz inertes) sont exprimés par un équivalent-azote, en utilisant un coefficient  $K_i$ , et dans laquelle la teneur équivalente en gaz inflammables  $A'_i$  s'exprime comme suit :

$$A'_i = A_i \times (100 / (A_i + K_i B_i))$$

En utilisant la valeur de la teneur maximale en gaz inflammables qui, dans un mélange contenant de l'azote, donne une composition qui n'est pas inflammable à l'air ( $T_{ci}$ ), on peut obtenir l'expression suivante :

$$\sum_i A'_i / T_{ci} \leq 1$$

Le mélange de gaz est inflammable lorsque la valeur de l'expression précitée est supérieure à 1. La préparation est classée extrêmement inflammable et la phrase R12 est attribuée.

Coefficients d'équivalence ( $K_i$ )

Les valeurs des coefficients d'équivalence  $K_i$  entre les gaz inertes et l'azote ainsi que les valeurs de la teneur maximale en gaz inflammables ( $T_{ci}$ ) figurent aux tableaux 1 et 2 de la norme ISO 10156, édition du 15.12.1990 (nouvelle édition 1996), relatives aux 'Gaz et mélanges de gaz - Détermination du potentiel d'inflammabilité et d'oxydation pour le choix des raccords de sortie de robinets'.

Teneur maximale en gaz inflammables ( $T_{ci}$ )

La valeur de la teneur maximale en gaz inflammables ( $T_{ci}$ ) figure au tableau 2 de la norme ISO 10156, édition du 15.12.1990 (nouvelle édition 1996), relative aux « Gaz et mélanges de gaz - Détermination du potentiel d'inflammabilité et d'oxydation pour le choix des raccords de sortie de robinets »

Lorsque la valeur  $T_{ci}$  d'un gaz inflammable ne figure pas dans la norme précitée, on utilisera la limite inférieure d'explosibilité (LIE). S'il n'existe aucune valeur LIE, la valeur  $T_{ci}$  sera fixée à 1 % en volume.



## Remarques :

— L'expression susmentionnée peut être employée pour permettre un étiquetage approprié des préparations gazeuses; elle ne doit cependant pas être considérée comme une méthode remplaçant l'expérimentation dans la détermination des paramètres techniques de sécurité.

— Par ailleurs, cette expression ne donne aucune information sur la possibilité de préparer ou non en toute sécurité un mélange contenant des gaz comburants. Ces derniers ne sont pas pris en considération dans l'évaluation de l'inflammabilité.

— L'expression susmentionnée ne donnera des résultats fiables que si les gaz inflammables ne s'influencent pas mutuellement du point de vue de leur inflammabilité. Il faut tenir compte de cet aspect, par exemple avec les hydrocarbures halogénés.

9.1.1.2. *Propriétés comburantes*

L'annexe V du présent arrêté ne contenant pas de méthode relative à la détermination des propriétés comburantes des mélanges gazeux, lesdites propriétés doivent être évaluées selon la méthode d'estimation suivante.

Le principe de cette méthode est de comparer le potentiel comburant des gaz dans un mélange au potentiel comburant de l'oxygène dans l'air. Les concentrations des gaz dans le mélange s'expriment en pourcentage en volume.

On considère que le mélange de gaz est aussi comburant ou plus comburant que l'air si la condition suivante est vérifiée :

$$\sum_i x_i C_i \geq 21$$

où :

$x_i$  est la concentration de gaz  $i$  en pourcentage en volume,

$C_i$  est le coefficient d'équivalence oxygène.

Dans ce cas, la préparation est classée comme comburante et se voit attribuer la phrase R8.

Coefficient d'équivalence entre les gaz comburants et l'oxygène

Les coefficients utilisés dans le calcul visant à déterminer le pouvoir comburant de certains gaz dans un mélange par rapport au pouvoir comburant de l'oxygène dans l'air, repris au point 5.2 de la norme ISO 10156 (nouvelle édition 1996) relative aux « Gaz et mélanges de gaz - Détermination du potentiel d'inflammabilité et d'oxydation pour le choix des raccords de sortie de robinets », sont les suivants :

O <sub>2</sub>	1
N <sub>2</sub> O	0,6

Lorsqu'il n'existe pas de valeur du coefficient ( $C_i$ ) pour une substance gazeuse dans la norme citée, une valeur de 40 est attribuée à ce coefficient.

9.1.2. *Etiquetage*

Pour les récipients de gaz transportables, on considère que les prescriptions relatives à l'étiquetage sont conformes lorsqu'elles sont conformes aux dispositions de l'article 10, paragraphe 6, *b*) de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

Toutefois, par dérogation à l'article 10, paragraphes 1 et 2, pour les récipients de gaz ayant une capacité en eau inférieure ou égale à 150 litres, le format et les dimensions de l'étiquette peuvent respecter les prescriptions de la norme ISO 7225 (édition 1994) relative aux 'Bouteilles à gaz - Étiquettes de risque'. Dans ce cas, l'étiquette peut mentionner le nom générique ou l'appellation industrielle ou commerciale de la préparation à condition que le nom des substances dangereuses entrant dans sa composition figurent de manière claire et indélébile sur le corps du récipient de gaz.

Les informations mentionnées à l'article 9 peuvent être fournies sur un disque ou une étiquette durable, solidement fixé au récipient.

**9.2. Récipients de gaz destinés à des préparations contenant du propane, du butane ou du gaz de pétrole liquéfié (GPL) nauséabonds**

Le propane, le butane et le gaz de pétrole liquéfiés sont classés à l'annexe I. Bien que les préparations contenant ces substances soient classées conformément aux articles 5, § 1<sup>er</sup>, § 2 et § 3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, elles ne présentent pas de danger pour la santé humaine lorsqu'elles sont placées sur le marché, comme gaz combustibles libérés uniquement en vue de leur combustion, dans des bouteilles fermées rechargées ou dans des cartouches non rechargeables couvertes par la norme EN 417 (EN 417, édition de septembre 1992, relative aux « cartouches métalliques pour gaz de pétrole liquéfiés, non rechargeables, avec ou sans valve, destinées à alimenter des appareils portatifs; construction, contrôle et marquage »).

Ces bouteilles et ces cartouches doivent être étiquetées avec le symbole approprié et les phrases R et S concernant l'inflammabilité. Il n'est pas requis d'indiquer sur l'étiquette les informations concernant les effets sur la santé humaine. Cependant, ces informations qui auraient dû apparaître sur l'étiquette seront transmises à l'utilisateur professionnel par la personne responsable de la mise sur le marché de la substance sous la forme prévue à l'article 12 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993. En ce qui concerne les consommateurs, il leur sera transmis suffisamment d'informations pour leur permettre de prendre toutes les mesures nécessaires pour la santé et la sécurité, comme le prévoit l'article 12, § 2, point 2.3 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993.

**9.3 Alliages, préparations contenant des polymères et préparations contenant des élastomères**

Ces préparations seront classées conformément aux exigences de l'article 5, § 1<sup>er</sup>, § 2 et § 3 et étiquetées conformément aux exigences de l'article 9 de l'AR du 11 janvier 1993.

Bien que classées conformément à l'article 5, § 2 et § 3, certaines de ces préparations ne présentent toutefois pas, dans leur forme commercialisée, de danger pour la santé de l'homme en cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau, ni de danger pour l'environnement aquatique. De telles préparations ne requièrent pas d'étiquetage en vertu de l'article 9 ou de l'annexe II, point B 9. Cependant, toutes les informations qui auraient dû figurer sur l'étiquette devront être communiquées à l'utilisateur professionnel au moyen d'un système d'information sous la forme prévue à l'article 12 de l'arrêté susmentionné.

**9.4. Préparations classées avec la phrase R65**

Pour les préparations classées nocives en raison du danger en cas d'aspiration, il n'est pas nécessaire de les étiqueter « nocif » avec la phrase R65 si elles sont placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation.



**9.5. Peroxydes organiques**

Les peroxydes organiques combinent les propriétés d'une substance comburante et d'une substance combustible en une seule molécule : lorsqu'un peroxyde organique se décompose, la partie comburante de la molécule réagit exothermiquement avec la partie combustible (oxydable). En ce qui concerne les propriétés comburantes, les méthodes reprises à l'annexe V ne peuvent être appliquées aux peroxydes organiques.

Il y a lieu d'utiliser la méthode de calcul suivante, basée sur la présence d'oxygène actif.

La teneur en oxygène (%) d'une préparation de peroxyde organique s'obtient par la formule :

$$16 \times \sum (n_i \times c_i / m_i)$$

où

$n_i$  = nombre de groupes peroxyde par molécule de peroxyde organique  $i$ ,

$c_i$  = concentration (masse en %) du peroxyde organique  $i$ ,

$m_i$  = masse moléculaire du peroxyde organique  $i$ .

**9.6. Exigences supplémentaires d'étiquetage pour certaines préparations**

Pour certaines préparations, des exigences supplémentaires d'étiquetages sont énoncées à l'article 9, paragraphe 1<sup>er</sup>, point 1.2 et à l'annexe II de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, ainsi qu'à l'article 40 de l'arrêté royal du 5 septembre 2001.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

---

Annexe III A

Pour les produits intermédiaires à exposition limitée, les dispositions du point 7 s'appliquent.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

---

Annexe III B

**7. Batterie d'essais réduite pour les produits intermédiaires dont la quantité est supérieure ou égale à une tonne par an****1. Définitions**

Sans préjudice des autres réglementations édictées sur base d'autres dispositions législatives communautaires, les définitions suivantes s'appliquent :

— « produit intermédiaire », une substance chimique qui est produite, consommée ou utilisée uniquement pour un traitement chimique afin d'être transformée en une autre ou (en d') autre(s) substance(s) chimique(s).

— « émission », la libération d'une substance en cas par exemple d'ouverture d'un système. L'objectif principal doit donc être de garantir un niveau maximal de protection des travailleurs et la minimalisation des émissions dans l'environnement par un confinement rigoureux du processus.

— « exposition », concerne ce qui se passe après émission de la substance, que celle-ci ait été émise dans l'environnement au sens large ou qu'elle soit susceptible d'être inhalée par un travailleur ou d'entrer en contact avec sa peau. Si des émissions sont prévisibles, un contrôle rigoureux de l'exposition doit être réalisé par des techniques appropriées, en gardant à l'esprit la nécessité d'adopter le principe de précaution selon lequel les propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques qui n'ont pas été testées doivent être considérées comme dangereuses.

— « système intégré de ventilation par aspiration », un système de ventilation par aspiration de type fermé utilisé en association avec des systèmes de verrouillage, des enceintes, des enveloppes, des conteneurs, etc., en vue de confiner les agents chimiques dans la partie interne de l'unité fonctionnelle fermée. Les ouvertures liées au processus doivent être aussi petites que possible.

La puissance d'extraction et les systèmes de ventilation doivent être conçus de façon à ce qu'il y ait une dépression suffisante dans l'unité d'extraction pour que tous les gaz, toutes les vapeurs et/ou toutes les poussières engendrés soient parfaitement captés et emportés. Les substances dangereuses évacuées ne doivent pas pouvoir refluer dans la zone de travail.

Dans ce type de configuration, les substances dangereuses ne peuvent se propager de l'unité fonctionnelle fermée vers la zone de travail.

— « système très efficace de ventilation par aspiration », un système de ventilation par aspiration de type ouvert ou semi-ouvert, dimensionné de telle façon que les agents chimiques restent dans la zone de captage. Cela signifie que la présence d'agents chimiques dans l'atmosphère du lieu de travail peut pratiquement être exclue.

— « système efficace de ventilation par aspiration », un système de ventilation par aspiration de type ouvert ou semi-ouvert, dimensionné de telle façon que les agents chimiques restent dans la zone de captage; en d'autres termes, la présence d'agents chimiques dans l'atmosphère du lieu de travail peut être exclue dans une large mesure ou le respect de la valeur limite est attesté.

— « autre système de ventilation par aspiration », un système de ventilation par aspiration de type ouvert ou semi-ouvert, dimensionné de telle façon que la présence d'agents chimiques dans l'atmosphère du lieu de travail ne peut pas être exclue.

— « conditions d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions », par exemple :

— l'emballage perdu, qui consiste à confiner la substance dangereuse dans un emballage approprié et à l'introduire dans un réacteur avec cet emballage, sans ouvrir ce dernier.

— le changement de consistance, c'est-à-dire l'utilisation de la substance sous forme de pâte ou de granulés plutôt que sous forme de poudre, par exemple.

— le master batch, qui consiste à entourer la substance dangereuse d'une matrice plastique qui empêche tout contact direct avec cette substance. La matrice plastique n'est pas une substance dangereuse. L'abrasion de la matrice plastique et donc la libération de la substance dangereuse est cependant possible.

— « conditions d'utilisation sans émissions », par exemple, des master batches sans abrasion (la matrice plastique est tellement résistante à l'abrasion qu'aucune substance dangereuse ne peut s'échapper).

— « techniquement étanche », la qualité d'une sous-unité dans laquelle aucune fuite n'est détectable au cours des essais, des contrôles ou des vérifications de l'étanchéité, par exemple à l'aide d'agents moussants ou de dispositifs de repérage ou de détection des points de fuites mis en place dans ce but précis. Les systèmes, sous-systèmes et éléments fonctionnels sont techniquement étanches si le débit de fuite est inférieur à  $0,00001 \text{ mbar} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ .

## 2. Demande de batterie d'essais réduite

Pour les produits intermédiaires, le notifiant peut demander au Ministre de lui accorder la permission de réaliser une batterie d'essais réduite (BER). La BER représente le niveau de base des informations destinées à fournir une évaluation des risques préliminaire pour tout produit chimique intermédiaire mis sur le marché. Conformément à l'article 5, § 2 II, des essais complémentaires peuvent être demandés, selon les résultats de l'évaluation des risques.

## 3. Conditions d'application d'une batterie d'essais réduite

Le notifiant doit démontrer, à la satisfaction du Ministre que les conditions suivantes sont remplies :

a) La substance est produite, consommée ou utilisée uniquement pour un traitement chimique. Les monomères sont exclus. Après traitement, la substance est transformée en molécules chimiquement différentes, qui ne sont pas des polymères.

b) La substance est limitée à 2 sites d'utilisation au maximum. Par exemple, elle peut être fabriquée par une entreprise puis transportée vers une ou deux autres pour y être traitée. Il convient de noter que si par la suite il est envisagé d'utiliser la substance dans plus de deux sites, les conditions permettant de réaliser une BER ne sont plus satisfaites et le dossier doit être revu en conséquence.

c) L'approvisionnement de l'entreprise qui utilise les produits intermédiaires pour un traitement ultérieur doit être effectué directement par le notifiant et non par un fournisseur intermédiaire.

d) La substance doit être confinée rigoureusement par des moyens techniques tout au long de son cycle de vie. Ce dernier comprend la production, le transport, la purification, le nettoyage et l'entretien, l'échantillonnage, l'analyse, le chargement et le déchargement des cuves/dispositifs, l'épuration/l'élimination des déchets et le stockage. En général, un processus adéquat, correspond à une installation dont tous les éléments fonctionnels tels que ouvertures de remplissage, dispositifs de vidage, etc., sont des dispositifs de type fermé dont l'étanchéité est garantie ou des dispositifs de type fermé équipé d'un système intégré de ventilation par aspiration.

e) S'il y a un risque d'exposition, il convient de mettre en œuvre des procédures et techniques de prévention visant à réduire autant que possible les émissions et l'exposition qui en résulte.

f) Lors des travaux d'entretien et de nettoyage, il convient d'appliquer des procédures spéciales, telles que celles qui permettent de purger et de laver, avant que quiconque n'ouvre le système ou n'y pénètre.

g) Les opérations de transport sont effectuées conformément aux dispositions de l'arrêté royal du 12 novembre 1998 relatif au transport des marchandises dangereuses par route à l'exception des matières explosibles et radioactives.

h) En cas d'accident et de production de déchets à la suite de procédures d'entretien, de nettoyage ou d'épuration, une exposition de l'environnement peut survenir. Dans chaque cas, des procédures et techniques de prévention sont utilisées pour réduire autant que possible les émissions et les expositions qui en résultent.

i) Un système de gestion doit être établi pour identifier les rôles de chacun dans l'organisation.

j) L'emballage de la substance est étiqueté conformément à l'annexe VI de l'AR du 24 mai 1982 et porte en outre le libellé suivant : « Attention - Substance non encore testée complètement ».

k) Le notifiant doit mettre en œuvre un système de gestion responsable du produit et doit s'assurer que les utilisateurs (2 au maximum) respectent les conditions énumérées ci-dessus.

## 4. Dossier technique à fournir pour une batterie d'essais réduite

Un notifiant demandant une BER pour une substance donnée doit fournir le dossier technique suivant au Ministre pour tous les sites de production et d'utilisation :

a) Une déclaration selon laquelle le notifiant et chaque utilisateur acceptent les conditions énumérées au point 3.

b) Une description des mesures techniques par lesquelles un confinement rigoureux de la substance est réalisé (1), y compris les procédures de remplissage, d'échantillonnage, de transfert et de nettoyage. Il n'est pas nécessaire de fournir des détails concernant l'intégrité de chaque joint ou l'efficacité du système intégré de ventilation par aspiration. Néanmoins, quels que soient les moyens utilisés pour atteindre un confinement rigoureux du processus, il est important que l'information soit disponible, si nécessaire, pour vérifier la véracité des déclarations en cas de contrôle.

c) Si les critères d'évaluation des systèmes fermés pendant la phase de manipulation d'agents chimiques (visés au point 5) ne sont pas remplis, le notifiant doit présenter des données d'évaluation de l'exposition fondées sur des données mesurées représentatives et/ou sur des calculs à l'aide de modèles fiables, afin de permettre au Ministre de se prononcer sur la demande de BER.

d) Une description détaillée des processus utilisés sur tous les sites de production et d'utilisation. En particulier, il convient de préciser si des déchets de production et/ou de traitement sont rejetés dans les eaux usées, si des déchets liquides ou solides sont incinérés, et comment le nettoyage et l'entretien de tous les équipements sont réalisés.

e) Une évaluation détaillée des possibilités d'émissions et d'exposition de l'homme et de l'environnement tout au long du cycle de vie de la substance, présentant en détail les différentes réactions chimiques qui surviennent au cours du processus et les modes de traitement des résidus.

Lorsque des émissions sont susceptibles d'entraîner une exposition, les moyens par lesquels elles sont maîtrisées doivent être décrits de manière suffisamment détaillée pour permettre au Ministre de décider d'accepter la déclaration ou de calculer un taux d'émission conformément au guide technique communautaire.

f) Les changements susceptibles d'avoir une incidence sur l'exposition de l'homme ou de l'environnement, par exemple toute modification des éléments fonctionnels de l'installation, l'existence d'un nouvel utilisateur ou d'un nouveau site, doivent être notifiés à l'avance.

g) Les informations requises pour la BER sont les suivantes :

Les informations demandées à l'annexe VII.B, plus les essais suivants, visés à cette annexe :

- pression de vapeur (3.4);
- propriétés explosives (3.11);
- température d'auto-inflammation (3.12);
- propriétés comburantes (3.13);
- granulométrie (3.15);
- toxicité aiguë pour la daphnie (5.1.2).

Le notifiant doit également inclure toute autre information pertinente pour que le Ministre puisse prendre une décision éclairée et que des mesures de contrôle appropriées soient mises en place par l'utilisateur sur le site de traitement du produit intermédiaire. Par exemple, si des informations toxicologiques et/ou physico-chimiques supplémentaires et/ou des informations sur le comportement de la substance dans l'environnement sont disponibles, elles doivent également être transmises. En outre, le notifiant doit examiner les informations disponibles en matière de toxicité et d'écotoxicité pour les substances ayant une relation structurelle étroite avec la substance notifiée. Si des informations pertinentes sont disponibles, notamment en ce qui concerne la cancérogenèse, la toxicité chronique ou la toxicité pour la reproduction, un résumé de ces informations doit être fourni.

h) Identités du notifiant, du fabricant et de l'utilisateur (ou des utilisateurs).

## 5. Critères pour l'évaluation de systèmes fermés lors de la manipulation d'agents chimiques

### 5.1 Utilisation

Un indice d'évaluation est utilisé pour évaluer l'installation. L'indice d'évaluation classe la manipulation de la substance et le potentiel d'exposition liée au processus correspondant. Le notifiant examine l'installation ou l'unité de l'installation pour déterminer l'indice d'évaluation. Chaque élément fonctionnel doit être évalué.

Les systèmes sont considérés comme fermés si l'évaluation de tous les éléments fonctionnels disponibles correspond à un indice d'évaluation de 0,5 et si les seuls éléments fonctionnels utilisés sont de type fermé, avec une étanchéité garantie et/ou un système intégré de ventilation par aspiration. En outre, le contact direct avec la peau doit être exclu.

Dans la liste d'exemples, les éléments fonctionnels répondant à ces critères ont un indice de 0,5, indiqué en gras.

Les éléments fonctionnels de type partiellement ouvert équipés d'un système très efficace de ventilation par aspiration (ayant également un indice d'évaluation de 0,5, mais indiqué en caractères normaux) ne sont pas considérés comme fermés au sens des critères définis.

Lorsque des éléments fonctionnels se voient attribuer un indice d'évaluation égal à 1, cela signifie que le respect de la valeur limite n'est pas toujours assuré de manière permanente. Ces éléments fonctionnels sont les suivants :

1 - les éléments de type fermé dont l'étanchéité n'est pas assurée.

1 - les éléments de type partiellement ouvert équipés d'un système efficace de ventilation par aspiration.

Pour les éléments fonctionnels auxquels sont attribués des indices d'évaluation de 2 ou 4, le respect des valeurs limites n'est pas toujours assuré. Ces éléments fonctionnels sont les suivants :

2 - les éléments de type partiellement ouvert, conçus pour fonctionner avec un système de ventilation par aspiration simple.

2 - les éléments ouverts équipés d'un système de ventilation par aspiration simple.

4 - les éléments de types ouvert ou partiellement ouvert.

4 - les éléments avec dispositif de ventilation naturelle.

La liste d'exemples du tableau n° 1 facilite le classement des éléments fonctionnels. Les éléments fonctionnels qui n'y figurent pas peuvent être classés par analogie. L'installation ou l'unité d'installation est ensuite classée à partir de la valeur de l'élément fonctionnel ayant reçu l'indice d'évaluation le plus élevé.

### 5.2 Vérification

Pour appliquer ce critère, il convient de respecter les paramètres définis pour les processus et d'effectuer les vérifications indiquées dans la liste d'exemples (par exemple, inspection et entretien).

## 6. Application de la batterie d'essais réduite

Si le Ministre accepte la demande du notifiant de ne présenter qu'une BER, le dossier technique visé à l'article 2, § 1<sup>er</sup> doit contenir les informations obtenues dans le cadre des essais et/ou des études définis au point 7.4. Pour des quantités inférieures à une tonne par an, les dispositions habituelles en matière d'essais visées aux annexes VII.B/VII.C s'appliquent.

## Notes

(1) Le type de systèmes et les spécifications techniques (par exemple, étanchéité) de l'élément fonctionnel déterminent l'efficacité du confinement. Pour permettre au Ministre de déterminer si un confinement rigoureux est réalisé ou non, il est essentiel que le notifiant joigne des détails sur ces aspects. Les mesures techniques doivent normalement satisfaire aux « critères pour l'évaluation des systèmes fermés lors de la manipulation d'agents chimiques », qui figurent à titre indicatif au point 7.5 et dans le tableau 1 de la présente annexe. Cela doit être indiqué par le notifiant, néanmoins, il n'est pas nécessaire de traiter chaque type d'élément fonctionnel fermé dans la description des mesures techniques fournie. Tout écart par rapport aux conditions fixées par les critères doit être décrit minutieusement et justifié.



Numéro	Éléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
1.3.2	<b>Autres</b>	tiges de réglage	<ul style="list-style-type: none"> <li>— presse-étoupe</li> <li>— presse-étoupe autoréglable (à ressort)</li> <li>— double presse-étoupe à barrière d'étanchéité</li> <li>— joint annulaire</li> <li>— joint de piston</li> <li>— joint à soufflet</li> <li>— joint à membrane</li> </ul>	2	1 en cas de contrôles et de réparations réguliers	au moyen de contrôles visuels réguliers ou de dispositifs techniques de contrôle du processus
2	<b>Joints dynamiques</b>		— moteur à gaine	0,5	<b>0,5 avec vérification du système à pression d'arrêt</b>	
2.1	<b>Joints à pièces tournantes</b>	hermétiquement scellés	— accouplements à aimant	0,5		
		joints autres que des joints sans contact	— joint mécanique à un axe	1		
			— joint mécanique à deux axes	1		
			— joint mécanique à deux axes avec barrière fluïdique	1	<b>0,5 avec vérification du système à pression d'arrêt par des contrôles réguliers, à raison d'une fois par jour en règle générale, ou, par exemple, par des dispositifs de contrôle du processus avec système d'alarme</b>	
			— presse-étoupe	2	1 en cas de contrôles et de réparations réguliers	
			— presse-étoupe autoréglable (à ressort)	2	<b>0,5 techniquement étanche</b>	
		joints sans contact	— labyrinthe	2		
		- joint à soufflet	— lubrification à gaz	1	<b>0,5 avec contrôle du flux de gaz</b>	
2.2	<b>Joints pour pièces oscillantes</b>	— joints à membrane	— robinets d'arrêt à soufflet	0,5		
			— pompes à piston alternatif munies d'un joint à soufflet	0,5		
			— pompes à membrane	0,5		
			— robinets à membrane conique	0,5		
		— joints en U	— pompes à piston alternatif	1		
			— segments racleurs	1		

Numéro	Eléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.	<b>Points de raccordement et de remplissage pour les substances solides</b>					
3.1	<b>Sacs</b>					
3.1.1	<b>Sacs (vidage)</b>					
3.1.1.1		trou d'homme ouvert, conteneur ouvert	— vidage manuel	4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration	la présence d'une substance dangereuse dans le conteneur doit être prise en compte
		machine d'ouverture et de vidage des sacs			1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration 0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion) 0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)	
		machine encapsulée d'ouverture et de vidage des sacs avec système intégré de ventilation par aspiration		1	<b>0,5 compression et emballage des sacs vidés dans la zone fermée, étanchéité garantie par des contrôles et des réparations</b>	
3.1.1.2	<b>Sacs (remplissage)</b>	remplissage manuel, remplissage des sacs à découvert	— remplissage manuel	4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration	
					1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration ) 0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)	
		dispositif de remplissage des sacs	— machine à remplir les sacs à valve, par exemple emballeuse pneumatique, emballeuse en spirale, balance pour remplissage en poids net	4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration	
					1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	



Numéro	Éléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.2	<b>Conteneurs souples, conteneurs semi-vrac</b>		— emballeuse sous vide	2	1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
3.1.2.1	<b>Conteneurs souples, conteneurs semi-vrac (vidage)</b>	trou d'homme ouvert  dispositif de déchargement des conteneurs souples	— machine à remplir les sacs entièrement encapsulée avec système intégré de ventilation par aspiration — ensacheuse verticale  — vidage manuel	1  1  4	<b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations (*)</b>  <b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations (*)</b>  1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration 0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion) 2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration 0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)	

Numéro	Éléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.2.2	<b>Conteneurs souples, conteneurs semi-vrac (remplissage)</b>	remplissage de sacs de grande dimension ouverts  dispositif de remplissage des conteneurs souples  dispositif de remplissage de conteneurs souples	— remplissage manuel  — remplissage à découvert  — machine de remplissage entièrement encapsulée, avec système intégré de ventilation par aspiration  — balance pour sacs de grande dimension	4  4  1	2 avec un autre système de ventilation par aspiration  1 avec un système efficace de ventilation par aspiration  1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente  0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration  0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)  2 avec un autre système de ventilation par aspiration  1 avec un système efficace de ventilation par aspiration  1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente  0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration  0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)  2 avec un autre système de ventilation par aspiration  1 avec un système efficace de ventilation par aspiration  1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente  0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration  0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)  2 avec un autre système de ventilation par aspiration  1 avec un système efficace de ventilation par aspiration  1 forme d'utilisation donnant lieu à de faibles émissions, aucune autre substance dangereuse présente  0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration  0,5 forme d'utilisation sans émissions (par exemple, master batch sans abrasion)	

Numéro	Eléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.3	<b>Conteneurs</b>	avec dispositif de vidage fermé		1		Le joint de couvercle du conteneur doit satisfaire aux exigences du point 1.2
3.1.3.1	<b>Conteneurs (vidage)</b>				0,5 si l'étanchéité est assurée par des mesures spéciales (par exemple, système contrôlé de fixation par fermeture automatique) et s'il existe un système intégré de ventilation par aspiration, l'étanchéité est garantie par des contrôles et des réparations (*)	
		conteneur ouvert		4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration	
				5	1 avec un système efficace de ventilation par aspiration	
3.1.3.2	<b>Conteneurs (remplissage)</b>	avec dispositif de remplissage spécial		1	0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
		remplissage à découvert		4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration	
					1 avec un système efficace de ventilation par aspiration	
3.1.4	<b>Fûts</b>	avec dispositif de vidage	— fermé	1	0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration, l'étanchéité est garantie par des contrôles et des réparations (*)	
					0,5 si l'étanchéité est assurée par des mesures spéciales (par exemple, système contrôlé de fixation par fermeture automatique) et s'il existe un système intégré de ventilation par aspiration	
3.1.4.1	<b>Fûts (vidage)</b>		— transport mécanique, par exemple par vis convoyeuse	4	0,5 si l'étanchéité est assurée par des mesures spéciales (par exemple, système contrôlé de fixation par fermeture automatique) et s'il existe un système intégré de ventilation par aspiration	
			— transport pneumatique, par exemple par soufflerie	4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration	
					1 avec un système efficace de ventilation par aspiration	
					0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	

Numéro	Eléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
		conteneur ouvert	— transport mécanique, par exemple par vis convoyeuse	4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
			— transport pneumatique, par exemple par soufflerie		2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
					2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
					2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
					2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
					2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
3.1.4.2	Fûts (remplissage)	avec dispositif de remplissage spécial  remplissage à découvert		1  4	<b>0,5 si l'étanchéité est assurée par des mesures spéciales (par exemple, système contrôlé de fixation par fermeture automatique) et s'il existe un système intégré de ventilation par aspiration</b>  0,5 si l'étanchéité est assurée par des mesures spéciales (par exemple, système contrôlé de fixation par fermeture automatique) et s'il existe un système très efficace de ventilation par aspiration	
					2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	

Numéro	Éléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.1.5	<b>Véhicules-silos</b>					
3.1.5.1	Véhicules-silos (vidage)	tuyauterie fixe, bras articulé  raccord pour tuyaux flexibles	— utilisation fixe (boyaux de raccord et éléments d'accouplement fournis par l'entreprise)  — autre utilisation (boyaux de raccord et éléments d'accouplement non fournis par l'entreprise)	1  1  2	0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*); récupération intégrale des quantités résiduelles pendant les phases de couplage et de découplage  0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*); récupération intégrale des quantités résiduelles pendant les phases de couplage et de découplage  1 récupération intégrale des quantités résiduelles	
3.1.5.2	<b>Véhicules-silos</b> (remplissage)	tuyauterie fixe, bras articulé  raccord pour tuyaux flexibles	— utilisation fixe (boyaux de raccord et éléments d'accouplement fournis par l'entreprise)  — autre utilisation (boyaux de raccord et éléments d'accouplement non fournis par l'entreprise)	1  2	0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*); récupération intégrale des quantités résiduelles pendant les phases de couplage et de découplage  0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*); récupération intégrale des quantités résiduelles pendant les phases de couplage et de découplage	
3.1.6	<b>Raccords d'arrivée et de sortie</b>	pour silos, dispositifs de remplissage, conteneurs vrac	— vanne papillon  — robinet et robinet d'arrêt  — vanne coulissante plate  — plaque de robinet-vanne  — robinet-vanne à manchon déformable, muni d'un joint souple  — robinet à diaphragme iris  — robinet de tuyau	1  1  1  1  1  1	<b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*): nettoyage régulier</b>  <b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*): nettoyage régulier</b>  <b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*): nettoyage régulier</b>  <b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*): nettoyage régulier</b>	

Numéro	Éléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.2	<b>Points de raccordement pour les substances liquides</b>					
3.2.1	<b>Petits conteneurs et fûts</b>					
3.2.1.1	<b>Petits conteneurs et fûts (vidage)</b>	raccords fixes (tuyauterie, raccords pour tuyaux flexibles, bras articulé)	— avec déplacement ou sortie de gaz en un point sûr ou transfert vers une installation de traitement ou d'incinération  — sans déplacement ou sortie de gaz en un point sûr  — avec pompe électrique portative ou tuyau flexible	1	<b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations<sup>(*)</sup>; essai d'étanchéité une fois le raccordement effectué, récupération intégrale des quantités résiduelles</b>	en ce qui concerne les éléments de raccordement, se reporter au numéro 1
		emballage en fûts ouverts		4	1 en l'absence de fuites et d'écoulements et si l'élément est équipé d'un système très efficace de ventilation par aspiration	vérification régulière du système de ventilation par aspiration; les petits conteneurs ou fûts doivent être fermés immédiatement après la phase de remplissage
		vidage en unités fermées	— encapsulation	1	<b>0,5 s'il existe un système intégré de ventilation par aspiration et si l'ouverture et la fermeture des fûts d'emballage se font en unité fermée</b>	vérification régulière du système de ventilation par aspiration
3.2.1.2	<b>Petits conteneurs et fûts (remplissage)</b>	raccords fixes (tuyauterie, raccords pour tuyaux flexibles, bras articulé)	— avec déplacement ou sortie de gaz en un point sûr ou transfert vers une installation de traitement ou d'incinération  — sans déplacement ou sortie de gaz	1	<b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations<sup>(*)</sup>; essai d'étanchéité une fois le raccordement effectué, récupération intégrale des quantités résiduelles</b>	en ce qui concerne les éléments de raccordement, se reporter au numéro 1
		emballage en fûts ouverts		4	1 en l'absence de fuites et d'écoulements et si l'élément est équipé d'un système efficace de ventilation par aspiration	vérification régulière du système de ventilation par aspiration; les petits conteneurs ou fûts doivent être fermés immédiatement après la phase de remplissage
			— avec boyau de remplissage	4	0,5 en l'absence de fuites et d'écoulements et si l'élément est équipé d'un système très efficace de ventilation par aspiration	vérification régulière du système de ventilation par aspiration; les petits conteneurs ou fûts doivent être fermés immédiatement après la phase de remplissage
			— encapsulation	1	<b>0,5 s'il existe un système intégré de ventilation par aspiration et si la fermeture des fûts d'emballage se fait en unité fermée</b>	vérification régulière du système de ventilation par aspiration



Numéro	Éléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
3.2.2	Camions-citernes, wagons-citernes, grands conteneurs					
3.2.2.1	Camions-citernes, wagons-citernes, grands conteneurs	raccordement fixe, par exemple tuyauterie fixe, raccords pour tuyaux flexibles, bras de chargement en acier	- avec déplacement ou sortie de gaz en un point sûr ou transfert vers une installation de traitement ou d'incinération	1	0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*); essai d'étanchéité une fois le raccordement effectué, récupération intégrale des quantités résiduelles	en ce qui concerne les éléments de raccordement, se reporter au numéro 1
		autres raccords pour tuyaux flexibles	- sans déplacement ou sortie de gaz	4		
3.2.2.2	Camions-citernes/wagons-citernes, grands conteneurs (remplissage)	tuyauterie fixe, raccords pour tuyaux flexibles, bras de chargement en acier	- avec déplacement ou sortie de gaz en un point sûr ou transfert vers une installation de traitement ou d'incinération	1	0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*), essai d'étanchéité une fois le raccordement effectué, récupération intégrale des quantités résiduelles	Les conteneurs doivent être fermés immédiatement après remplissage
		remplissage à découvert	- sans déplacement ou sortie de gaz	4		
3.3	Gaz émanant des points de raccordement		- conduite de remplissage	4	1 avec système très efficace de ventilation par aspiration, récupération intégrale des quantités résiduelles	Les conteneurs doivent être fermés immédiatement après remplissage
3.3.1	Gaz (remplissage et vidage)			1	0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*); essai d'étanchéité une fois le raccordement effectué; déplacement du gaz ou aspiration du gaz résiduel en un point sûr ou transfert vers une installation de traitement ou d'incinération	En ce qui concerne les éléments fonctionnels, se reporter au numéro 1;  Les systèmes d'exploitation, les composants d'unités et les éléments fonctionnels fermés doivent être utilisés, contrôlés et entretenus de manière à rester techniquement étanches en cas de contraintes mécaniques, chimiques et thermiques correspondant au type d'exploitation envisagé.

Numéro	Eléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
4	<b>Points de prélèvement</b>					
4.1	<b>Système de prélèvement ouvert</b>		valve, robinet	4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	
4.2	<b>Système de prélèvement fermé</b>			1	<b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations (*)</b>	les échantillons doivent être prélevés par un système de prélèvement fermé permettant d'éviter un échappement incontrôlé du produit. Par échappement incontrôlé du produit, il faut entendre : — la projection de liquide pendant le prélèvement de produits dans des éléments pressurisés; — l'écoulement de liquide d'éléments de raccord pour tuyaux flexibles reliés à l'unité d'échantillonnage; — l'échappement de vapeurs; — le débordement de cuves d'échantillonnage trop remplies
5	<b>Emballage en fûts</b>					
5.1	<b>Substances solides, à l'exception de certains explosifs</b>	Emballage conforme aux réglementations en matière de transport de marchandises dangereuses ADR	— fûts, conteneurs  — Sacs (plastique, textile, papier et sacs multicouches)	0,5		avec ventilation suffisante (air renouvelé deux fois minimum)
5.2	<b>Substances solides, certains explosifs (contenant de la nitroglycérine)</b>	Emballage conforme aux réglementations en matière de transport de marchandises dangereuses ADR		4	2 avec un autre système de ventilation par aspiration 1 avec un système efficace de ventilation par aspiration 0,5 avec un système très efficace de ventilation par aspiration	avec ventilation suffisante (air renouvelé deux fois minimum)

Numéro	Eléments fonctionnels	Systèmes utilisés	Exemples de systèmes utilisés	Indice d'évaluation		Explications
				Sans	avec mesures complémentaires	
1	2	3	4	5	6	7
5.3	<b>Substances liquides</b>	Emballage conforme aux réglementations en matière de transport de marchandises dangereuses ADR	— conteneurs, fûts métalliques, emballages en fer-blanc, fûts en plastique, tubes, bidons, conteneurs	0,5	<b>0,5 étanchéité garantie par des contrôles et des réparations(*)</b>	avec ventilation suffisante (air renouvelé deux fois minimum)
5.4	<b>Gaz</b>	Emballage conforme aux réglementations en matière de transport de marchandises dangereuses ADR	bouteilles de gaz comprimé,  réservoirs de gaz comprimé, fûts de gaz comprimé	1		avec ventilation suffisante (air renouvelé deux fois minimum)

(\*) L'étanchéité des raccords séparables reliant certaines unités de l'installation à des parties du système peut être assurée par la mise en œuvre, en permanence, des mesures suivantes :

**1. Mesures de contrôle ou d'inspection visant à déterminer et à évaluer l'état réel du raccord séparable, conformément à la norme EN 13306 (en cours d'élaboration).**

Ces mesures doivent être mises en œuvre à des moments prédéterminés et conformément à un plan correspondant aux besoins spécifiques de la société, au type de raccordement et de système ainsi qu'à la nature et aux propriétés des agents chimiques transportés. Ces mesures peuvent consister, par exemple, en :

- des essais d'étanchéité;
- un examen visuel de l'installation visant à identifier les fuites évidentes, telles que les points de ruissellement; un examen visant à identifier les traînées, les odeurs, les bruits, la formation de glace, etc.;
- une inspection de l'installation à l'aide de dispositifs mobiles de repérage et de détection de fuites (par exemple, tubes de détection de gaz, détecteurs à ionisation de flamme, appareils portatifs pour la détection de gaz );
- l'application d'agents moussants sur les raccords séparables;
- l'utilisation de détecteurs de gaz pour contrôler l'atmosphère;
- l'utilisation d'un dispositif automatique de détection de fuites pour les tuyaux articulés ou les boyaux de remplissage.

**2. Mesures de réparation visant à rétablir l'état optimal du raccord séparable, conformément à la norme EN 13306 (en cours d'élaboration).**

Les mesures susceptibles d'être exigées doivent être planifiées et mises en œuvre au cas par cas, en tenant compte des facteurs suivants :

- substance dangereuse en cause;
- type et importance des dégâts;
- mesures de protection et de sécurité à prendre.

Avant de reprendre l'exploitation de l'installation, il faut soumettre les raccordements réparés à des essais complets d'étanchéité.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

## Annexe IVA

Quand, conformément aux dispositions de l'annexe VII.A relatives aux produits intermédiaires, le Ministre a autorisé qu'une substance chimique fasse l'objet d'une batterie d'essais réduite, les prescriptions de la présente section sont réduites de la manière suivante.

— si la quantité de substance mise sur le marché atteint 10 tonnes par an par fabricant ou si la quantité totale mise sur le marché atteint 50 tonnes par fabricant; dans ce cas, le Ministre exige la réalisation de tous les essais et de toutes les études visés aux points 3 à 6 de l'annexe VII.A (à l'exception de ceux déjà réalisés); en outre, le Ministre peut exiger la réalisation des essais et études du niveau 1 relatifs aux organismes aquatiques.

— si la quantité de substance mise sur le marché atteint 100 tonnes par an par fabricant ou si la quantité totale mise sur le marché atteint 500 tonnes par fabricant; dans ce cas, le Ministre exige la réalisation des essais et études du niveau 1 relatifs à la toxicité pour la reproduction. Le Ministre peut décider que la substance ayant été classée comme produit intermédiaire pouvant faire l'objet d'une batterie d'essais réduite, un ou plusieurs des essais et études, à l'exception de ceux concernant la toxicité pour la reproduction, ne sont pas appropriés.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

## Annexe IV B

Quand la quantité de substance mise sur le marché atteint 1 000 tonnes par an et par fabricant ou quand la quantité totale mise sur le marché atteint 5 000 tonnes par fabricant, les études complémentaires mentionnées aux niveaux 1 ou 2 ne devraient normalement pas être exigées. Le Ministre devrait cependant réfléchir à d'autres essais et il peut demander des essais supplémentaires, notamment ceux mentionnés aux niveaux 1 et 2 de la présente annexe.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 juillet 2002.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET