

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

### **Micro-organismes du sol : essai de transformation du carbone**

#### **INTRODUCTION**

1. La présente Ligne directrice concerne une méthode d'essai conçue pour étudier en laboratoire les effets à long terme sur l'activité de transformation du carbone par les micro-organismes du sol que des produits phytosanitaires et d'autres substances chimiques peuvent exercer à la suite d'une application unique. L'essai est principalement basé sur les recommandations de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (1). Cependant d'autres lignes directrices ont également été prises en compte, notamment celles de la Biologische Bundesanstalt de l'Allemagne (2), de la Environmental Protection Agency des Etats-Unis (3) et de la SETAC (4). Le nombre et les types de sol qui sont utilisés dans l'essai ont été convenus lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection de sols et sédiments tenu à Belgirate en Italie en 1995 (5). Les recommandations pour la collecte, la manipulation et la conservation des échantillons de sol sont basées sur le document d'orientation de l'ISO (6) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate.

#### **REMARQUES PRELIMINAIRES**

2. Pour l'évaluation des caractéristiques de toxicité d'une substance il peut être nécessaire de déterminer les effets de la substance sur l'activité microbienne du sol. Tel est le cas par exemple lorsque des données sont requises sur les effets secondaires possibles de produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou lorsqu'on peut s'attendre à l'exposition des micro-organismes du sol à des substances autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation du carbone permet de saisir les effets de telles substances sur la microflore du sol. Dans le cas de produits agrochimiques (tels que produits phytosanitaires, engrais, produits utilisés en sylviculture) deux essais s'imposent: celui de la transformation du carbone et celui de la transformation de l'azote. Dans le cas de substances autres qu'agrochimiques l'essai de transformation de l'azote suffit. Cependant, si les valeurs  $CE_{50}$  obtenues dans l'essai de transformation de l'azote sont dans la gamme des inhibiteurs de nitrification que l'on trouve dans le commerce (la nitrapyrine, par exemple), des informations complémentaires peuvent être obtenues en effectuant un essai de transformation du carbone.

3. Les sols sont des mélanges complexes et hétérogènes de matières vivantes et non vivantes. Les micro-organismes ont un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique dans les sols fertiles avec de nombreuses espèces apportant des contributions aux différents aspects de la fertilité. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques peut modifier le cycle des substances nutritives et affecter la fertilité du sol. La transformation du carbone et celle de l'azote se produisent dans tous les sols fertiles. Quoique les souches microbiennes qui sont à l'origine de ces transformations diffèrent d'un sol à un autre, les voies de la transformation sont essentiellement les mêmes.

4. L'essai décrit dans cette Ligne directrice est destiné à la détection des effets à long terme d'une substance sur le processus de transformation du carbone dans des sols de surface aérobies. L'essai est sensible aux modifications de la dimension et de l'activité des populations microbiennes qui sont à l'origine de la transformation du carbone et qui subissent des perturbations chimiques et une privation de carbone. Dans l'essai un sol sablonneux pauvre en matière organique est utilisé. Le sol est traité avec la substance d'essai et incubé dans des conditions qui favorisent un métabolisme microbien rapide. Dans ces conditions les sources de carbone aisément disponible deviennent rapidement épuisées. Il en résulte une privation de carbone qui tue des cellules microbiennes et induit la latence et/ou la sporulation. Si l'essai est conduit pendant 28 jours ou plus, l'ensemble de ces réactions peut être mesuré par rapport à des témoins (sol non traité) comme une perte progressive de la biomasse microbienne métaboliquement active (7). Si la biomasse d'un sol privé de carbone est affectée par une substance chimique pendant l'essai, elle peut ne pas retourner à l'état qui est celui du témoin. Par conséquent des perturbations causées par la substance d'essai à un quelconque moment de l'essai peuvent souvent perdurer jusqu'à la fin de l'essai.

5. Les essais à partir desquels cette Ligne directrice a été développée sont principalement conçus pour des substances dont la quantité qui atteint le sol peut être prévue. Tel est le cas par exemple des produits phytosanitaires dont la dose d'application sur le terrain est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de tester à deux niveaux de dose qui sont en relation avec la dose d'application prévue. Les pesticides peuvent être testés en tant qu'ingrédients actifs ou en tant que préparations chimiques. L'essai n'est cependant pas limité aux seuls produits pour lesquels la concentration environnementale peut être prévue. Il peut également être utilisé pour des produits dont on ne connaît pas la quantité qui atteindra le sol. Dans ce cas, il convient de tester à plusieurs niveaux de dose différents et de changer la manière d'évaluer les résultats. S'agissant de produits non agrochimiques on détermine les effets d'une série de concentrations sur la transformation du carbone. Avec les résultats on établit une courbe dose-réponse et on calcule des valeurs  $CE_x$ , où x représente le taux en pourcentage de l'effet.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

6. Du sol tamisé est d'une part traité avec la substance d'essai et d'autre part laissé sans traitement (témoin). Lorsque la substance d'essai est un produit agrochimique ou une substance dont la quantité qui atteint le sol peut être prévue, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations choisies par rapport à la concentration la plus forte prévue sur le terrain. Après 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, des échantillons de sol traité et de sol témoin sont mélangés avec du glucose et les taux de respiration induite par le glucose sont mesurés pendant 12 heures d'affilée. Les taux de respiration sont exprimés en dioxyde de carbone émis (mg de dioxyde de carbone/kg de sol sec/heure) ou en oxygène consommé (mg d'oxygène/kg de sol/heure). Le taux moyen de respiration des échantillons traités est comparé à celui du témoin et le pourcentage de déviation est calculé. Tous les essais sont poursuivis pendant 28 jours au moins. Si les différences au 28<sup>ème</sup> jour sont égales ou supérieures à 25%, les mesures sont continuées jusqu'à un maximum de cent jours à des intervalles de 14 jours. Lorsqu'il s'agit de substances autres que les produits agrochimiques, une série de concentrations de la substance d'essai sont ajoutées à des échantillons de sol. Les taux de respiration induite par la glucose (c'est-à-dire la moyenne des quantités de dioxyde de carbone formé ou d'oxygène consommé) sont mesurées après 28 jours. Les résultats sont analysés à l'aide d'un modèle par régression et les valeurs  $CE_x$  ( $CE_{50}$ ,  $CE_{25}$ , et/ou  $CE_{10}$ ) sont calculées. Voir définitions en annexe.

## **VALIDITE DE L'ESSAI**

7. L'évaluation des résultats obtenus avec des produits agrochimiques est fondée sur des différences relativement faibles entre dioxyde de carbone formé ou oxygène consommé par les sols traités d'une part et les sols témoin d'autre part, la moyenne étant d'environ 25%. De grandes variations dans les témoins peuvent donner de faux résultats. Pour cette raison la variation entre les répliques des témoins ne devrait pas dépasser  $\pm 15\%$ .

## **DESCRIPTION DE LA METHODE**

### **Appareillage**

8. Les récipients utilisés dans l'essai sont faits en des matériaux chimiquement inertes. Leur capacité doit être appropriée à la procédure d'incubation du sol choisie (incubation d'une seule masse de sol importante ou incubation de plusieurs échantillons) (voir le paragraphe 23). Pendant l'essai il faut minimiser la perte d'humidité tout en permettant l'échange gazeux, par exemple en recouvrant les récipients d'une feuille de polyéthylène perforée. Lorsque des substances volatiles sont soumises à l'essai, des récipients hermétiquement fermés doivent être utilisés. Leur capacité doit être telle que l'échantillon de sol n'occupe qu'un quart du volume disponible.

9. Pour la mesure de la respiration induite par le glucose il faut pouvoir disposer de systèmes d'incubation et d'un appareillage de détermination du dioxyde de carbone formé ou d'oxygène consommé. Il existe des exemples de tels systèmes et appareils dans la littérature (8)(9)(10)(11).

### **Choix et nombre des sols**

10. Un seul sol est utilisé. Il est recommandé qu'il réponde aux caractéristiques suivantes:

- teneur en sable : pas moins de 50% et pas plus de 75% ;
- pH entre 5,5 et 7,5;
- teneur en carbone organique entre 0,5 et 1,5 %
- la biomasse microbienne doit être mesurée (12),(13) et son contenu en carbone doit représenter au moins 1 % du carbone organique total du sol.

11. Un sol avec les caractéristiques recommandées représente généralement des conditions de "pire cas", une situation dans laquelle la substance d'essai est faiblement adsorbée et est largement disponible pour la microflore. Par conséquent, des essais avec d'autres sols ne sont généralement pas nécessaires. Dans certaines circonstances cependant, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue vise un sol particulier, comme un sol forestier acide ou lorsque la substance d'essai est chargée électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol supplémentaire.

### **Collecte et conservation des échantillons de sol**

#### **Collecte**

12. Une information détaillée sur l'historique du site dans lequel le sol d'essai est prélevé doit être disponible. L'information doit comprendre la localisation exacte, la couverture végétale, les dates des traitements avec des produits phytosanitaires, des applications d'engrais organiques et inorganiques, des additions de matières biologiques et des contaminations accidentelles. Le site choisi doit permettre des prélèvements répétés de sol sur le long terme. Des prairies permanentes ou des champs de cultures céréalières

annuelles (à l'exception du maïs) ou d'engrais verts fortement ensemencés conviennent. Le site sélectionné pour le prélèvement d'échantillons ne doit pas avoir été traité avec un produit phytosanitaire depuis un an au moins avant le prélèvement. En outre, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué depuis au moins six mois. Les engrais minéraux ne doivent être utilisés que conformément aux exigences de la culture et il ne faut pas prélever des échantillons de sol durant les trois mois suivant leur application. L'emploi d'engrais à effet biocide connu (par exemple le cyanamide de calcium) doit être évité.

13. Il ne faut pas faire de prélèvement de sol pendant ou immédiatement après de longues périodes (supérieures à 30 jours) de sécheresse ou d'imbibition. Dans les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur comprise entre 0 et 20 cm. Dans les prés ou autres sols qui ne sont pas labourés sur de longues périodes (une saison de culture au moins) le prélèvement peut être fait jusqu'à une profondeur légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple).

14. Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et à des conditions de température telles que les caractéristiques initiaux du sol sont maintenues.

### **Conservation**

15. La préférence est donnée à des échantillons fraîchement prélevés. Les sols peuvent être conservés, si cela est nécessaire, dans l'obscurité à  $4 \pm 2$  °C pour une période n'excédant pas trois mois. Pendant la conservation des conditions aérobies sont à observer. Si les échantillons proviennent de terrains qui restent gelés pendant au moins trois mois dans l'année, ils peuvent être conservés pendant six mois à une température allant de -18 à -22 °C. La biomasse microbienne de sols qui ont été conservés est mesurée avant chaque essai et le carbone contenu dans la biomasse doit être au moins 1 % de la teneur totale de carbone organique (voir paragraphe 10).

### **Manipulation et préparation du sol pour l'essai**

#### **Pré-incubation**

16. Dans le cas d'un sol qui a été conservé (voir paragraphe 15) une pré-incubation de 2 à 28 jours est recommandée. La température et le degré d'humidité du sol au cours de la pré-incubation doivent être voisins des conditions de l'essai (voir paragraphes 17 et 24).

#### **Caractéristiques physico-chimiques**

17. Le sol est débarrassé manuellement des objets encombrants (pierres, restes de plantes, etc.) et ensuite tamisé à l'état humide, et sans séchage excessif, à une dimension de particules égale ou inférieure à 2 mm. L'humidité de l'échantillon doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à un pourcentage final de 40 - 60 % de sa capacité en eau maximale.

### **Préparation de la substance d'essai en vue de l'application au sol**

18. La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un véhicule. Le véhicule peut être de l'eau (pour les substances solubles) ou du sable de quartz fin (dimension des particules: 0,1 à 0,5 mm). Il faut éviter les véhicules autres que l'eau (par exemple, les solvants organiques comme l'acétone et le chloroforme) qui pourraient endommager la microflore. Dans le cas du sable, on peut l'imprégner avec la substance préalablement dissoute ou mise en suspension dans un solvant. Ce dernier est évaporé avant l'application sur le sol. Pour obtenir une bonne distribution de la substance d'essai dans le sol il est recommandé d'utiliser 10 g de sable par kg de sol (poids à sec). Les échantillons témoin sont traités uniquement avec de l'eau ou du sable en quantité identique à celle utilisée dans les échantillons traités.

19. Lorsque la substance d'essai est volatile, il faut dans la mesure du possible éviter les pertes pendant l'application et veiller à ce que la distribution dans le sol soit la plus homogène possible (on peut par exemple injecter la substance à plusieurs endroits dans l'échantillon de sol).

### **Concentrations d'essai**

20. Dans le cas de produits agrochimiques, au moins deux concentrations d'essai doivent être employées. La plus faible doit refléter la quantité de produit supposée atteindre le sol dans les conditions normales d'utilisation tandis que la plus forte est un multiple de la plus faible. Les concentrations de la substance d'essai additionnées au sol sont calculées sur les bases d'une incorporation uniforme jusqu'à une profondeur de 5 cm et d'une densité apparente du sol de 1,5. Pour des produits agrochimiques qui sont appliqués directement au sol ou pour des produits chimiques pour lesquels on peut prévoir la quantité atteignant le sol, les concentrations d'essai recommandées sont la concentration environnementale maximale prévue et cinq fois cette concentration. Les substances pour lesquelles plusieurs applications sont prévues au cours d'une saison devraient être testées à des concentrations calculées en multipliant la dose la plus forte appliquée par le nombre maximal d'applications prévu. La concentration d'essai la plus forte devrait cependant ne pas être supérieure à dix fois le taux maximal d'une seule application.

21. Pour des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations en progression géométrique sont mises en oeuvre. Ces concentrations doivent recouvrir la plage nécessaire à la détermination des valeurs  $CE_x$ .

## **EXECUTION DE L'ESSAI**

### **Conditions d'exposition**

#### **Traitement et témoin**

22. Lorsque la substance d'essai est un produit agrochimique le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Le véhicule contenant le produit est mélangé à deux de ces fractions et le véhicule seul sans produit est mélangé à la troisième qui sert de témoin. Il est recommandé de préparer les échantillons de sol traité et le témoin en trois exemplaires au moins. Lorsqu'il s'agit de produits non agrochimiques, il faut utiliser six fractions de même poids. Cinq fractions sont mélangées avec le véhicule contenant le produit et la sixième, qui contient uniquement le véhicule, est utilisée comme témoin. Il est recommandé de préparer trois exemplaires de chaque échantillon. Les soins nécessaires doivent être apportés afin d'assurer une distribution homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. En effectuant le mélange il faut éviter de compacter ou d'agglomérer le sol.

#### **Incubation des échantillons de sol**

23. L'incubation peut être faite de deux façons: en seulement deux masses (l'une du sol traité et l'autre du sol non traité) ou en une série de petits échantillons individuels de même poids de sol traité et non traité. Dans la première façon, de grandes quantités de sol traité et de sol non traité sont préparées et des échantillons sont prélevés pendant l'essai selon les besoins. Les quantités nécessaires sont fonction de la taille des échantillons, du nombre d'exemplaires soumis à analyse et de la fréquence de l'échantillonnage. Les masses qui sont incubées doivent être soigneusement mélangées avant la prise d'échantillons. Dans la seconde façon, l'incubation d'une série de petits échantillons, chaque masse de sol, traité et non traité, est subdivisée en le nombre requis de petits échantillons qui sont utilisés selon les besoins. Pour les essais pour lesquels on prévoit plus de deux moments d'analyse il faut préparer assez de petits échantillons pour satisfaire aux besoins de plusieurs exemplaires et plusieurs moments d'analyse. Cette façon d'incuber s'impose dans le

cas de produits volatils. Au moins trois répliques du sol d'essai sont incubées dans des conditions d'aérobie (voir paragraphe 22) et ceci nécessite des récipients appropriés présentant un espace libre suffisant pour éviter que des conditions d'anaérobie se développent. Quand il s'agit de substances volatiles, l'essai doit être effectué avec une série de sous-échantillons individuels.

### **Conditions et durée de l'essai**

24. L'essai est effectué dans l'obscurité à une température ambiante de  $20 \pm 2$  °C. L'humidité des échantillons de sol doit être maintenue tout au long de l'essai à  $40 - 60 \% \pm 5 \%$  de la capacité en eau maximale du sol (voir paragraphe 17). De l'eau distillée ou désionisée peut être ajoutée selon les besoins.

25. La durée minimale des essais est 28 jours. Dans le cas de produits agrochimiques, les quantités de dioxyde de carbone formé ou d'oxygène consommé par les échantillons traités sont comparées avec celles observées dans les témoins. Si la différence au 28<sup>ème</sup> jour est supérieure à 25 %, l'essai est continué jusqu'à ce que la différence devienne égale ou supérieure à 25 %, mais sans dépasser une durée totale de 100 jours. Dans le cas de produits non agrochimiques, l'essai est terminé après 28 jours. A partir des quantités d'oxyde de carbone formé ou d'oxygène consommé au 28<sup>ème</sup> jour dans les échantillons traités et dans les témoins les valeurs  $CE_x$  sont calculées.

### **Analyse des échantillons**

#### **Fréquence des analyses**

26. Dans les essais avec des produits agrochimiques les taux de respiration induite par le glucose sont déterminés aux jours 0, 7, 14 et 28. Lorsque l'essai doit être prolongé après 28 jours des analyses supplémentaires sont faites tous les 14 jours après le 28<sup>ème</sup> jour.

27. Dans les essais avec des produits non agrochimiques, dans lesquels au moins cinq concentrations sont testées, les taux de respiration induite par le glucose sont déterminés au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (jour 28). Le cas échéant une détermination intermédiaire peut être insérée, par exemple au jour 7. La valeur de  $CE_x$  est déduite des données obtenues au jour 28. Les données obtenues à partir des témoins au jour 0 peuvent servir à l'estimation de la quantité initiale de biomasse métaboliquement active dans le sol (12).

#### **Détermination des taux de respiration induite par le glucose**

28. Le taux de respiration induite par le glucose de chaque exemplaire de sol traité et de chaque témoin est mesuré à chaque moment d'analyse. Les échantillons de sol sont mélangés avec des quantités suffisantes de glucose permettant l'obtention immédiate d'une réponse respiratoire maximale. Ces quantités peuvent être déduites d'un essai préliminaire mettant en oeuvre une série de concentrations de glucose (14). Généralement il faut 2000 à 4000 mg de glucose par kg de sol sec dans le cas d'un sol sablonneux à 0,5 à 1,5 % de carbone organique. Le glucose peut être réduit en poudre en le mélangeant avec du quartz (10 g de quartz/kg de sol sec) et le tout est homogénéisé et ajouté au sol.

29. Les échantillons de sol contenant du glucose sont incubés à  $20 \pm 2$  °C dans un appareillage permettant de mesurer le taux de respiration. La mesure peut être effectuée de façon continue ou chaque heure ou encore toutes les deux heures (voir paragraphe 9). Les mesures commencent aussitôt que possible, par exemple 1 à 2 heures après l'addition de glucose, et sont faites pendant 12 heures. Les quantités totales de dioxyde de carbone libéré ou d'oxygène consommé au cours des 12 heures sont mesurées et les moyennes sont établies.

## **RESULTATS ET RAPPORT**

### **Résultats**

30. Dans les essais avec des produits agrochimiques il faut consigner les quantités de dioxyde de carbone formé ou d'oxygène consommé pour chaque exemplaire d'échantillon de sol et reporter les valeurs moyennes de tous les exemplaires dans un tableau. Les résultats doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement acceptées, comme par exemple le test F à un niveau de signification de 5 %. Les taux de respiration induite par le glucose sont exprimés en mg de dioxyde de carbone ou mg d'oxygène/kg de sol à sec/h. Le taux moyen de respiration induite par le glucose trouvé à chaque niveau de dose est comparé à celui du témoin et le pourcentage de déviation est calculé.

31. Lorsque l'essai concerne un produit non agrochimique les quantités de dioxyde de carbone formé ou d'oxygène consommé par chaque exemplaire d'échantillon de sol est déterminée et une courbe dose-réponse est établie afin de calculer les valeurs  $CE_x$ . Les taux de respiration induite par le glucose (mg de dioxyde de carbone ou d'oxygène /kg de sol sec/h) trouvés au 28ème jour dans les échantillons traités sont comparés à celui du témoin. A partir de ces données on calcule le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Ces pourcentages sont portés en fonction des concentrations et à l'aide de procédés statistiques on calcule les valeurs CE. Les limites de confiance (à  $p = 0,95$ ) des valeurs  $CE_x$  calculées sont également établies à l'aide des procédés habituels (15)(16)(17).

### **Interprétation des résultats**

32. Dans l'évaluation des résultats obtenus avec des produits agrochimiques et lorsque la différence entre les taux de respiration à la concentration la plus faible (qui est celle qui correspond à la concentration environnementale maximale prévue) et dans le témoin est égale ou inférieure à 25 % pour les mesures effectuées après le 28ème jour, on peut conclure qu'il n'y a pas d'effet à long terme sur la transformation de carbone dans les sols. Dans l'évaluation des résultats obtenus avec des substances autres que des produits agrochimiques, il faut utiliser les valeurs  $CE_{50}$ ,  $CE_{25}$  et/ou  $CE_{10}$ .

### **Rapport d'essai**

33. Le rapport doit comporter les informations suivantes:

L'identification complète du sol utilisé, entre autres:

- coordonnées géographiques du site (latitude, longitude) ;
- l'historique du site (couverture végétale, traitements phytosanitaires, utilisations d'engrais contaminations accidentelles, etc.) ;
- l'utilisation (agriculture, forêt, etc.) ;
- profondeur de prélèvement (cm) ;
- teneur en sable, limon, argile (% de poids à sec) ;
- pH dans l'eau ;
- teneur en carbone organique (% de poids à sec) ;
- teneur en azote (% de poids à sec) ;
- capacité d'échange cationique (mmole/kg) ;
- biomasse microbienne initiale (% de carbone organique total) ;
- références des méthodes utilisées dans la détermination de chaque paramètre ;
- toute information sur la collecte et la conservation des échantillons de sol ;
- détails sur la préincubation, le cas échéant.

Substance d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques ;
- données relatives à l'identification et, le cas échéant, la formule de structure, la pureté (pour les produits phytosanitaires le pourcentage de la matière active), la teneur en azote.

Conditions de l'essai:

- détails sur l'apport de substrat organique au sol ;
- nombre des concentrations de la substance d'essai utilisées et, le cas échéant, justification des concentrations choisies ;
- détails sur l'application de la substance d'essai au sol ;
- température d'incubation ;
- humidité du sol au début et pendant l'essai ;
- méthode utilisée pour incuber le sol (en une seule masse ou en une série de petits échantillons) ;
- nombre d'exemplaires soumis à analyse ;
- moments d'analyse.

Résultats:

- méthode et équipement utilisés pour la mesure du taux de respiration ;
- tableaux des valeurs individuelles et moyennes des quantités de dioxyde de carbone ou d'oxygène ;
- variations entre les exemplaires des échantillons traités et des témoins ;
- explication des corrections apportées aux calculs, le cas échéant ;
- les variations en pourcentage entre les taux de respiration induite par la glucose à chaque moment d'analyse ou, le cas échéant, les valeurs  $CE_{50}$  avec des limites de confiance de 95 %, d'autres  $CE_x$  (par exemple  $CE_{25}$  ou  $CE_{10}$ ) avec les intervalles de confiance, et une présentation graphique de la courbe dose-réponse ;
- le traitement statistique des résultats, le cas échéant ;
- toutes les informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.

- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York
- (12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

ANNEXEDEFINITIONS

La transformation du carbone est la dégradation ultime de la matière organique aboutissant à la formation finale du dioxyde de carbone grâce à l'action des micro-organismes.

$CE_x$  (la concentration produisant un effet) est la concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit une inhibition de la transformation du carbone de x pour cent.

$CE_{50}$  (la concentration produisant un effet médian) est la concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit une inhibition de 50 pour cent de la transformation du carbone.