

LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Micro-organismes du sol : essai de transformation de l'azote

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 de l'azote par les micro-organismes du sol que des 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), de la SETAC (4) et de l'Organisation Internationale de Standardisation (5). 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 (6). Les recommandations pour la collecte, la manipulation et la conservation des échantillons de sol sont basées sur le document d'orientation de l'ISO (7) 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 de l'azote 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 de l'azote et celui de la transformation du carbone. 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 de l'azote dans des sols de surface aérobies. Il permet également d'évaluer les effets des substances sur la transformation du carbone par la microflore du sol. La formation de nitrate est consécutive à la dégradation des liaisons carbone-azote. Pour cette raison, lorsque les taux de production de nitrate sont égaux entre un sol traité et un sol témoin, il est hautement probable que les voies

majeures de la dégradation du carbone sont intactes et fonctionnelles. Le substrat sélectionné pour l'essai (de la farine de luzerne en poudre) est caractérisé par un rapport carbone/azote favorable, généralement compris entre 12 et 16. Dans ces conditions, le danger que les colonies de bactéries puissent souffrir pendant l'essai de privation de carbone est réduit et, si elles sont endommagées par une substance chimique, elles peuvent récupérer dans les cent jours.

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 agrochimiques. 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 de l'azote. 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, auquel on a ajouté de la farine de plantes en poudre, 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 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 du sol traité et du sol témoin sont extraits à l'aide d'un solvant approprié et les quantités de nitrate extraites sont déterminées. Les taux de formation de nitrate dans les échantillons traités sont comparés à ceux des témoins et les pourcentages de déviation sont calculés. Tous les essais sont poursuivis pendant 28 jours au moins. Si les différences au 28^{ème} jour sont égales ou supérieures à 25% les mesures sont continuées jusqu'à un maximum de cent jours. Lorsqu'il s'agit de substances autres que des produits agrochimiques, une série de concentrations de la substance d'essai sont ajoutées à des échantillons de sol. Les quantités de nitrate formées sont mesurées après 28 jours d'incubation. 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 les concentrations de nitrate des sols traités et celles des sols témoin, 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 24). 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. Un équipement normal de laboratoire est utilisé. Il comportera un agitateur mécanique ou autre, une centrifugeuse à 3000 g ou un système de filtration avec du papier filtre exempt de nitrate, et l'équipement pour l'analyse de nitrate qui aura la sensibilité et la reproductibilité requises.

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 (8)(9) 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, 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 ± 2 °C pour une période n'excédant pas trois mois. Pendant la conservation, des conditions aérobies sont observées. 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 25).

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.

Modification du sol avec un substrat organique

18. Le sol doit être amendé avec un substrat organique approprié, par exemple de la luzerne en poudre (composant principal: *Medicago sativa*) avec un rapport C/N entre 12/1 et 16/1. Il est recommandé d'ajouter 5 g de luzerne par kg de sol (poids à sec).

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

19. 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 liquides 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.

20. 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

21. Dans le cas des 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 concentration environnementale prévue 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.

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

EXECUTION DE L'ESSAI

Conditions d'exposition

Traitement et témoin

23. 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 substances autres que des produits agrochimiques, il faut avoir 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 traités. En effectuant le mélange il faut éviter de compacter ou d'agglomérer le sol.

Incubation des échantillons de sol

24. 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'aérobic (voir paragraphe 23) et ceci nécessite des récipients appropriés présentant un espace libre suffisant pour éviter que des conditions d'anaérobic 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

25. L'essai est effectué dans l'obscurité à une température ambiante de 20 ± 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.

26. La durée minimale des essais est 28 jours. Dans le cas des produits agrochimiques, les taux de formation de nitrate dans les échantillons traités sont comparés avec ceux observés dans les témoins. Si la différence est supérieure à 25 % au 28^{ème} jour, 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 de nitrate présentes au 28^{ème} jour dans les échantillons traités et dans les témoins les valeurs CE_x sont calculées.

Analyse des échantillons

Fréquence des analyses

27. Dans les essais avec des produits agrochimiques le nitrate est mesuré 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^{ème} jour.

28. Dans les essais avec des produits non agrochimiques, dans lesquels au moins cinq concentrations sont testées, le nitrate est mesuré au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (jour 28). Le cas échéant une analyse intermédiaire peut être insérée, par exemple au jour 7. La valeur de CE_x est déduite des données obtenues au jour 28. La quantité de nitrate initialement présente dans le sol peut être calculée à partir de la mesure faite dans le témoin au jour 0.

Analyse des échantillons

29. A chaque moment d'analyse on mesure la quantité de nitrate qui s'est formée dans chaque exemplaire d'échantillon de sol traité et de sol témoin. Le nitrate est extrait par agitation du sol avec un solvant approprié, par exemple une solution 0,1 M de chlorure de potassium. Il est recommandé d'utiliser 5 ml de solution de KCl par gramme de sol (poids à sec). Le mélange est agité pendant une heure dans des récipients remplis à moitié à la fréquence de 150 rotations par minute pendant une heure. Le mélange est ensuite centrifugé ou filtré et la phase liquide est analysée pour le nitrate. Les extraits exempts de particules peuvent être conservés à moins 20 ± 5 °C pendant six mois en attendant l'analyse.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

30. Dans les essais avec des produits agrochimiques il faut consigner la quantité de nitrate formée dans chaque exemplaire d'échantillon de sol et reporter dans un tableau les valeurs moyennes de tous les exemplaires. Les quantités sont exprimées en mg de nitrate/kg de sol à sec/jour. Les taux de transformation de l'azote 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 %. Le taux de formation de nitrate observé pour un niveau de traitement donné est comparé à celui du témoin et le pourcentage de déviation est calculé.

31. Lorsque l'essai concerne un produit non agrochimique la quantité de nitrate formé dans chaque exemplaire des échantillons de sol est déterminée et une courbe dose-réponse est établie afin de calculer les valeurs CE_x . Les quantités de nitrate (en mg/kg de sol à sec) présentes au 28^{ème} jour dans les échantillons traités sont comparées à celles présent dans les témoins. 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_x . Des limites de confiance des valeurs CE_x (à $p = 0,95$) sont également établies à l'aide des procédés habituels (10)(11)(12).

32. Des substances d'essais contenant beaucoup d'azote peuvent contribuer à la formation de nitrate pendant l'essai. Lorsque de telles substances sont testées à de fortes concentrations, ce qui peut être le cas pour un produit appliqué de façon répétée, il faut inclure dans l'essai des témoins constitués de sol auquel on ajoute la substance mais pas de farine de plantes. Dans les calculs de CE_x il faut tenir compte du nitrate formé dans ces témoins.

Interprétation des résultats

33. Dans l'évaluation des résultats obtenus avec des produits agrochimiques et lorsque la différence entre les taux de nitrate à la concentration la plus faible (qui est celle qui correspond à la concentration environnementale 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 l'azote 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

34. 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) ;
- concentration initiale de nitrate (mg/kg de poids à sec) ;
- capacité d'échange cationique (mMole/kg) ;
- biomasse microbienne (% 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 pré-incubation, 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.

Substrat:

- origine du substrat ;
- composition (luzerne) ;
- teneur en carbone et en azote (en pourcentage du poids à sec) ;
- granulométrie (en mm).

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 ;
- méthodes utilisées pour l'extraction du nitrate du sol.

Résultats:

- procédure et équipement utilisés pour l'analyse de nitrate ;
- tableaux des valeurs individuelles et moyennes des mesures de nitrate ;
- 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 formation de nitrate 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 ;
- 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.

ANNEXE

DEFINITIONS

La transformation de l'azote est la dégradation ultime de la matière organique contenant de l'azote, aboutissant à la formation de nitrate inorganique, par des processus d'ammonification et de nitrification dûs 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 de l'azote en nitrate de x pour cent.

CE₅₀ (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 de l'azote en nitrate.