

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

Transformation aérobie et anaérobie dans le sol

INTRODUCTION

1. Cette Ligne directrice s'appuie sur des lignes directrices existantes (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). La méthode décrite ici est destinée à évaluer la transformation aérobie et anaérobie des produits chimiques dans le sol. Les essais ont pour objectif de déterminer i) la vitesse de transformation de la substance d'essai et ii) la nature et le rythme de la formation et de la dégradation des produits de transformation auxquels les plantes et les organismes du sol risquent d'être exposés. Ces études sont requises pour des substances chimiques appliquées directement sur le sol ou susceptibles d'atteindre ce dernier. Les résultats de ces études en laboratoire peuvent aussi servir à mettre au point des modes opératoires d'échantillonnage et d'analyse pour des études connexes sur le terrain.

2. Les études aérobies et anaérobies réalisées sur un seul type de sol suffisent généralement pour évaluer les voies de transformation (8)(10)(11). Les vitesses de transformation doivent être déterminées sur au moins trois types de sols supplémentaires (8)(10).

3. Les participants à l'atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments (10), qui s'est tenu à Belgirate (Italie) en 1995, ont établi le nombre et les types de sols à utiliser dans cet essai. Les types de sols testés devraient être représentatifs des conditions ambiantes dans lesquelles les substances chimiques sont employées ou rejetées. Il faudra, par exemple, tester les produits chimiques susceptibles d'être rejetés sous des climats subtropicaux ou tropicaux avec des ferrasols ou des nitosols (système FAO). L'atelier a également émis des recommandations concernant la collecte, le traitement et le stockage des échantillons de sol, d'après les lignes directrices de l'ISO (12). La présente Ligne directrice aborde aussi l'utilisation des sols de rizières.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Les échantillons de sol traités avec la substance d'essai sont incubés à l'obscurité dans des flacons biométriques ou des appareils dynamiques, dans des conditions de laboratoire bien définies (à teneur en eau du sol et température constantes). Au terme d'intervalles de temps appropriés, on extrait des échantillons de sol afin d'analyser la substance d'essai de départ et ses principaux produits de transformation. Les produits volatils sont recueillis au moyen de dispositifs d'absorption adéquats et également analysés par intervalles. Il est possible, à l'aide de produits marqués au ^{14}C , de mesurer les différentes vitesses de minéralisation de la substance d'essai, en piégeant le $^{14}\text{CO}_2$ qui se dégage, et d'établir ainsi un bilan massique incluant la formation de résidus fixés aux constituants du sol.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

5. La méthode est applicable à toutes les substances chimiques (non marquées ou marquées par un élément radioactif) pour lesquelles on dispose d'une méthode d'analyse suffisamment sensible et précise.

Elle s'applique à des produits légèrement volatils, non volatils, solubles ou non dans l'eau. L'essai ne convient pas aux substances très volatiles dans le sol (p. ex. fumigants, solvants organiques), qui ne peuvent donc pas rester dans le sol dans les conditions expérimentales de cet essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

6. Les substances d'essai marquées ou non peuvent être utilisées pour mesurer la vitesse de transformation. Mais seules les molécules marquées se prêtent à l'étude de la voie de transformation et à l'établissement d'un bilan massique. On recommande le marquage au ^{14}C , mais d'autres isotopes comme ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P peuvent aussi convenir. Le marqueur devra autant que possible se situer dans la ou les parties les plus stables de la molécule¹. Le degré de pureté de la substance d'essai sera d'au moins 95 pour cent.

7. Avant de pratiquer un essai de transformation aérobie et anaérobie dans le sol, il faudrait connaître les informations suivantes sur la substance d'essai :

- (a) solubilité dans l'eau [Ligne directrice 105 de l'OCDE] (13);
- (b) solubilité dans les solvants organiques ;
- (c) pression de vapeur [Ligne directrice 104 de l'OCDE] (13) et constante de la loi de Henry ;
- (d) coefficient de partage n-octanol/eau [Lignes directrices 107 et 117 de l'OCDE] (13);
- (e) stabilité chimique à l'obscurité (hydrolyse) [Ligne directrice 111 de l'OCDE] (13);
- (f) pKa si la molécule est sujette à la protonation ou à la déprotonation [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (13).

8. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes du sol pourront aussi s'avérer utiles [Lignes directrices 216 et 217 de l'OCDE] (13).

9. Il faudrait disposer de méthodes d'analyse (notamment d'extraction et de purification) pour quantifier et identifier la substance d'essai et ses produits de transformation.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

10. On emploie des substances de référence pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

DÉFINITIONS

11. Voir à l'annexe 1.

¹ Si, par exemple, la substance d'essai renferme un cycle, ce dernier doit être marqué ; si la substance d'essai contient deux ou plusieurs cycles, il faudra peut-être conduire des études supplémentaires afin d'évaluer le devenir de chaque cycle marqué et d'obtenir des informations pertinentes sur la formation des produits de transformation.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Récupération

12. L'extraction et l'analyse d'au moins deux échantillons de sol immédiatement après l'ajout de la substance d'essai donnent une première indication de la répétabilité de la méthode d'analyse et de l'uniformité de la procédure d'application pour la substance d'essai. Aux stades ultérieurs des essais, le taux de récupération se déduit des bilans massiques de chaque substance. Le pourcentage de récupération devrait être compris entre 90 et 110 pour cent pour les produits marqués (8) et entre 70 et 110 pour cent pour les produits non marqués (3).

Répétabilité et sensibilité de la méthode d'analyse

13. La répétabilité de la méthode d'analyse (à l'exclusion du rendement d'extraction initial) destinée à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être vérifiée par l'analyse répétée une fois du même extrait de sol, incubé suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

14. La limite de détection de la méthode d'analyse appliquée à la substance d'essai et aux produits de transformation devrait atteindre au moins $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de sol ou 1 pour cent de la dose employée selon celle des deux valeurs qui est la plus faible. Il y a lieu de stipuler également la limite de quantification.

Précision des résultats de la transformation

15. L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps fournit une idée valable de la fiabilité de la courbe de transformation et permet de calculer les intervalles de confiance des demi-vies (dans le cas d'une pseudo-cinétique de premier ordre) ou du TD_{50} et, le cas échéant, du TD_{75} et du TD_{90} .

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Matériel et réactifs

16. Les dispositifs d'incubation consistent en des systèmes statiques fermés ou des systèmes dynamiques appropriés (7)(14). Les figures 1 et 2 représentent respectivement un exemple adéquat d'appareil dynamique et de flacon biométrique, tous deux destinés à incuber des extraits de sol. Les deux types de systèmes d'incubation présentent des avantages et des limites (7)(14).

17. Matériel courant de laboratoire, notamment :

- des instruments d'analyse, notamment pour la chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) et la chromatographie en couche mince, couplés à des systèmes de détection permettant d'analyser des substances radiomarquées ou non, ou à un appareil permettant de pratiquer la méthode de la dilution isotopique inverse ;
- des instruments d'identification (p. ex. spectrométrie de masse (SM), chromatographie en phase gazeuse-SM, CLHP-SM, résonance magnétique nucléaire, etc.) ;
- compteur à scintillation en phase liquide ;

- oxydateur pour la combustion des matières radioactives ;
- centrifugeuse ;
- extracteur (p. ex. tubes à centrifuger pour l'extraction à froid et appareil de Soxhlet pour l'extraction continue avec reflux);
- appareils permettant de concentrer les solutions et les extraits (p. ex. évaporateur à rotation) ;
- bain aqueux ;
- mélangeur mécanique (p. ex. malaxeur, mélangeur rotatif) ;

18. Réactifs cités à titre d'exemple :

- NaOH, qualité pour analyse, 2 moles $\bullet \text{ dm}^{-3}$, ou une autre base adéquate (p. ex. KOH, éthanolamine) ;
- H_2SO_4 , qualité pour analyse, 0,05 moles $\bullet \text{ dm}^{-3}$;
- Éthylèneglycol, qualité pour analyse ;
- Solides absorbants tels que la chaux sodée et les bouchons de polyuréthane ;
- Solvants organiques de qualité pour analyse, comme l'acétone, le méthanol etc. ;
- Liquide à scintillation.

Application de la substance d'essai

19. Pour ajouter la substance d'essai au sol et la répartir dans ce dernier, on peut la dissoudre dans de l'eau (désionisée ou distillée) ou, si nécessaire, dans une quantité minimale d'acétone ou d'un autre solvant organique (6) dans lequel la substance d'essai est suffisamment soluble et stable. Néanmoins, la quantité de solvant choisie ne devra pas exercer une influence sensible sur l'activité microbologique du sol (voir paragraphes 8 et 44). L'emploi de solvants qui inhibent l'activité microbologique, comme le chloroforme, le dichlorométhane et d'autres solvants halogénés, est à éviter.

20. La substance d'essai peut aussi être introduite sous forme solide, par exemple mélangée à un sable de quartz (6) ou incorporée à un petit sous-échantillon du sol testé, préalablement séché à l'air et stérilisé. Si la substance d'essai est véhiculée par un solvant, on attendra que ce dernier soit évaporé avant d'ajouter le sous-échantillon surchargé à l'échantillon de sol non stérile original.

21. Dans le cas des produits chimiques courants, qui doivent leur présence dans le sol à deux facteurs principaux : l'infiltration des boues d'épuration et leur utilisation en agriculture, il faut d'abord ajouter la substance d'essai à la boue avant de l'introduire dans l'échantillon de sol (voir paragraphe 41).

22. L'utilisation de préparations chimiques n'est pas recommandée de façon générale. Mais elle peut toutefois faciliter l'incorporation des substances d'essai peu solubles, le cas échéant.

Sols

Sélection du sol

23. La voie de transformation peut être déterminée sur un sol représentatif ; on recommande un limon sableux, un limon fin, un limon ou un sable limoneux [d'après la classification de la FAO et de la USDA (15)] avec un pH de 5,5-8,0, une teneur en carbone organique de 0,5-2,5 pour cent et une biomasse microbienne d'au moins 1 pour cent de la teneur totale en carbone organique (10).

24. Pour étudier la vitesse de transformation, on utilisera au moins trois sols supplémentaires représentatifs d'une série de sols pertinents. Les sols choisis devraient varier du point de vue de la teneur en carbone organique, du pH, de la proportion d'argile et de la biomasse microbienne (10).

25. Tous les sols seront caractérisés, au moins quant à leur texture (% de sable, % de limon, % d'argile) [conformément à la classification de la FAO et de l'USDA (15)], pH, capacité d'échange cationique, carbone organique, densité en vrac, rétention d'eau² et biomasse microbienne (uniquement pour

² La rétention d'eau d'un sol peut être mesurée en termes de capacité au champ, de capacité de rétention d'eau ou de pression d'aspiration d'eau (pF). Pour les explications, se reporter à l'annexe 2. Il faudrait préciser dans le rapport d'essai si la rétention d'eau et la densité en vrac ont été déterminées sur des échantillons de sols intacts ou ayant subi une préparation.

les études en aérobiose). Des informations supplémentaires sur les propriétés du sol peuvent être utiles à l'interprétation des résultats. L'expérimentateur peut recourir aux méthodes recommandées dans les références (16)(17)(18)(19)(20) pour déterminer les caractéristiques du sol. On détermine la biomasse microbienne par la méthode de la respiration induite par le substrat (21)(22) ou par d'autres méthodes (17).

Collecte, traitement et stockage des sols

26. Il faudrait rassembler des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement de l'échantillon de sol à tester, et décrire notamment sa localisation exacte, le couvert végétal, les traitements aux produits chimiques, les traitements aux engrais organiques et minéraux, l'apport de matériaux biologiques ou d'autres contaminations. Les sols déjà traités avec la substance d'essai ou un de ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes ne conviennent pas aux études de transformation (10)(12).

27. On utilisera un sol fraîchement prélevé (dans l'horizon A ou sur une couche de 20 cm de profondeur à partir de la surface) dont la teneur en eau facilite le tamisage. Pour les sols autres que ceux des rizières, on évitera d'effectuer des prélèvements pendant ou immédiatement après une longue période (> 30 jours) de sécheresse, de gel ou d'inondation (12). On s'efforcera de transporter les échantillons dans des conditions qui limitent au maximum la variation de la teneur en eau du sol et de les conserver dans un endroit aussi aéré que possible et à l'abri de la lumière. Un sac de polyéthylène fermé de façon non hermétique remplit généralement ces conditions.

28. Le sol doit être préparé dès que possible après le prélèvement. Il faut retirer les végétaux, les représentants macroscopiques de la faune pédologique et les pierres, avant de le tamiser à travers des mailles de 2 mm qui retiennent les petites pierres ainsi que les débris animaux et végétaux. On évitera de soumettre le sol à un séchage et à un broyage poussés avant le tamisage (12).

29. Si le prélèvement du sol s'avère difficile en hiver (sol gelé ou recouvert de plusieurs couches de neige), il peut être extrait d'une réserve de sol entreposée dans une serre sous un couvert végétal (par exemple de l'herbe ou un mélange d'herbe et de trèfle). Les études pratiquées sur des sols qui viennent d'être prélevés sont nettement préférables, mais s'il est nécessaire de conserver le sol collecté et traité un certain temps avant d'entamer l'essai, le stockage doit se faire dans des conditions appropriées et sans excéder une certaine durée ($4 \pm 2^\circ\text{C}$ et trois mois au maximum) afin de maintenir l'activité microbiologique³. Le lecteur trouvera des instructions détaillées sur le prélèvement, le traitement et le stockage des sols qui se prêtent aux essais de biotransformation dans les références (8)(10)(12)(23)(24).

30. Avant de procéder à l'essai sur le sol préparé, il faudra le soumettre à une préincubation pour permettre la germination et l'élimination des semences et rétablir l'équilibre du métabolisme microbiologique, avant de passer des conditions de prélèvement ou de stockage aux conditions d'incubation. Une période de préincubation comprise entre 2 et 28 jours, menée dans des conditions de température et d'humidité similaires à celles de l'essai, suffit généralement (12). Les durées du stockage et de la préincubation additionnées ne doivent pas dépasser trois mois.

DEROULEMENT DE L'ESSAI

Conditions d'essai

³ Des recherches récentes indiquent que les sols des zones tempérées peuvent aussi être stockés à -20°C pendant plus de trois mois (25) (26) sans que leur activité microbiologique ne diminue de manière significative.

Température de l'essai

31. Pendant toute la durée de l'essai, les sols doivent être incubés à l'obscurité, à une température constante qui soit représentative des conditions climatiques de l'utilisation ou du rejet de la substance d'essai. Une température de 20 ± 2 °C est recommandée pour toutes les substances d'essai susceptibles d'atteindre le sol dans les régions tempérées. La température doit être contrôlée en continu.

32. Pour les produits chimiques appliqués ou rejetés sous des climats plus froids (par exemple dans les pays nordiques, en automne ou en hiver), on incubera des échantillons de sol supplémentaires à une température inférieure (p. ex. 10 ± 2 °C).

Teneur en eau

33. S'agissant des essais de transformation aérobie, la teneur en eau du sol⁴ doit être ajustée et maintenue à un pF compris entre 2,0 et 2,5 (3). La teneur en eau du sol est exprimée en masse d'eau par masse de sol sec et on la contrôlera régulièrement (p. ex. toutes les deux semaines) en pesant le flacon d'incubation et les pertes d'eau compensées par l'addition d'eau (de préférence de l'eau du robinet filtrée avec du matériel stérile). On s'efforcera d'empêcher ou de limiter au maximum les pertes de la substance d'essai et/ou des produits de transformation par volatilisation et/ou photodégradation, le cas échéant, durant l'addition d'eau.

34. Les essais de transformation anaérobie et ceux qui reproduisent les conditions de rizières seront pratiqués sur des sols saturés en eau par engorgement.

Conditions d'incubation en aérobie

35. Dans les systèmes dynamiques, l'aérobie est maintenue par injection intermittente d'un gaz ou par ventilation permanente avec de l'air humidifié. Dans les flacons biométriques, l'échange d'air est assuré par diffusion.

Aérobiose en milieu stérile

36. Si l'on souhaite évaluer la pertinence de la transformation non biologique d'une substance d'essai, on peut stériliser des échantillons de sol (les références 13 et 26 décrivent des méthodes de stérilisation), les traiter avec la substance d'essai stérile (p. ex. en introduisant la solution à travers un filtre stérile) et les aérer avec de l'air stérile humidifié, conformément à ce qui est exposé au paragraphe 35. Pour les sols de rizières, l'incubation sera conduite selon les instructions données au paragraphe 38, avec du sol et de l'eau stérilisés.

⁴ Le sol ne doit être ni trop humide, ni trop sec pour que l'aération et la nutrition de la microflore pédologique demeurent adéquates. Les teneurs en eau recommandées pour une croissance optimale des micro-organismes sont comprises entre 40 et 60 pour cent de la capacité de rétention d'eau et entre 0,1 et 0,33 bars (6). La dernière fourchette correspond à une gamme de pF comprise entre 2,0 et 2,5. L'annexe 3 fournit les valeurs habituelles de la teneur en eau de différents types de sols.

Conditions d'incubation en anaérobiose

37. Pour créer et maintenir l'anaérobiose, on incube le sol traité avec la substance d'essai en aérobie pendant 30 jours ou une demi-vie, TD_{50} , (selon ce qui est le plus court), avant de le noyer (sous une couche de 1 à 3 cm d'eau) et d'injecter un gaz inerte dans l'enceinte d'incubation (p. ex. de l'azote ou de l'argon)⁵. Le dispositif expérimental doit permettre de mesurer le pH, la concentration en oxygène et le potentiel rédox, notamment, et comporter un piège pour collecter les substances volatiles. L'appareil biométrique doit être fermé pour empêcher l'air d'entrer par diffusion.

Conditions d'incubation du sol à paddy

38. Pour l'étude de la transformation dans les sols à paddy, le sol est noyé sous une couche d'eau d'environ 1 à 5 cm et la substance d'essai appliquée dans la phase aqueuse (26). Il est recommandé d'utiliser un sol d'au moins 5 cm de profondeur. Le système est ventilé à l'air comme en aérobie. Le pH, la concentration d'oxygène et le potentiel rédox de la couche aqueuse doivent être mesurés régulièrement et consignés dans le rapport. Une période de préincubation d'au moins deux semaines est nécessaire avant de commencer les études de transformation (voir au paragraphe 30).

Durée de l'essai

39. Les études portant sur la vitesse et la voie de transformation ne doivent normalement pas dépasser 120 jours⁶ (3)(6)(8), car au-delà, on peut s'attendre à un déclin progressif de l'activité microbiologique du sol dans un système de laboratoire privé des apports que reçoit un système dans son milieu naturel. S'il est nécessaire de caractériser le déclin de la substance d'essai ainsi que la formation et le déclin des principaux produits de transformation, les études peuvent être prolongées (p. ex. jusqu'à 6 ou 12 mois) (8). Dans le rapport d'essai, il faut justifier les périodes d'incubation plus longues et mentionner les mesures de la biomasse prises pendant et à la fin de ces périodes.

Traitement et application de la substance d'essai

40. L'expérimentateur dépose environ 50 à 200 g de sol (poids sec) dans chaque flacon d'incubation (voir aux figures 1 et 2 à l'annexe 4) et traite le sol avec la substance d'essai selon l'une des méthodes décrites aux paragraphes 19 à 22. Si la substance d'essai est véhiculée dans un solvant organique, ce dernier doit être éliminé du sol par évaporation. Ensuite on mélange le sol à fond au moyen d'une spatule et/ou en agitant le flacon. Si l'étude est réalisée dans les conditions de rizières, il convient de bien mélanger le sol et l'eau après que la substance d'essai ait été appliquée. Puis on analyse de petites aliquotes du sol traité (p. ex. 1 g) pour vérifier si la substance d'essai est répartie uniformément. Une autre méthode est proposée au paragraphe 42.

⁵ L'aérobiose prédomine dans les sols superficiels et même dans les sous-sols, comme l'a montré un projet de recherche parrainé par l'UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. L'anaérobiose ne peut s'instaurer qu'occasionnellement quand les sols sont noyés, après de fortes pluies ou quand les conditions nécessaires à la culture sont mises en place dans les rizières.

⁶ Les études en aérobie peuvent s'achever bien avant le délai de 120 jours, si l'on est sûr d'avoir atteint le stade ultime de la transformation et de la minéralisation. L'essai peut durer plus de 120 jours ou jusqu'à ce que au moins 90 pour cent de la substance d'essai ait été transformée, mais seulement si au moins 5 pour cent du CO_2 s'est formé.

41. La dose du traitement devrait correspondre à la dose la plus élevée d'application du produit phytosanitaire recommandée dans le mode d'emploi ; le produit est incorporé uniformément au sol, jusqu'à une profondeur appropriée dans le champ (p. ex. dans une couche de 10 cm⁷ à partir de la surface). S'agissant par exemple des produits chimiques appliqués sur les feuilles ou au sol sans incorporation, la profondeur qui permet de déduire la quantité de produit à introduire dans chaque flacon est de 2,5 cm. Dans le cas des produits incorporés au sol, la profondeur appropriée est celle stipulée dans le mode d'emploi. Pour les produits chimiques courants, on estime la dose d'application en se référant à la voie de pénétration dans le sol la plus pertinente ; si, par exemple, un produit provient essentiellement des boues d'épuration, il y a lieu de l'ajouter à la boue à une concentration qui reflète sa concentration habituelle dans la boue et d'ajouter une quantité de cette boue au sol du même ordre que la charge habituelle en boue des sols agricoles. Si cette concentration est trop faible pour permettre à l'expérimentateur d'identifier les principaux produits de transformation, il peut être utile d'incuber des échantillons de sol supplémentaires renfermant des doses plus élevées, mais il faut éviter de recourir à des doses trop élevées qui perturberaient l'activité microbiologique du sol (voir aux paragraphes 8 et 19).

42. Une autre solution consiste à traiter une plus grande quantité de sol (un à deux kilos) avec la substance d'essai, bien mélangée au moyen d'un appareil adéquat, puis à transférer ce mélange par petites portions de 50 à 200 g dans les flacons d'incubation (p. ex. à l'aide de séparateurs d'échantillons). Ensuite, on analyse de petites aliquotes du sol traité (p. ex. 1 g) pour vérifier si la substance d'essai est répartie uniformément. Cette procédure est préférable car elle permet une répartition plus homogène de la substance d'essai dans le sol.

43. Par ailleurs, on incube des échantillons de sol non traités dans les mêmes conditions (aérobiose) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons servent à mesurer la biomasse pendant et à la fin des études.

44. Si la substance d'essai appliquée sur le sol est véhiculée par un ou plusieurs solvants organiques, il faut incuber des échantillons de sol non traités avec la même quantité de solvant(s) dans les mêmes conditions (aérobiose) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Dans ces échantillons, on mesure la biomasse au début, pendant et à la fin des études pour voir si le ou les solvants ont une incidence sur la biomasse microbienne.

45. Les flacons contenant le sol traité sont soit reliés les uns aux autres pour former le système dynamique décrit à la figure 1, soit fermés par la colonne d'absorption illustrée à la figure 2 (voir annexe 4).

⁷ Calcul de la concentration initiale d'après la concentration par unité de surface à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{sol} [mg / kg_{sol}] = \frac{A [kg / ha] \cdot 10^6 [mg / kg]}{l [m] \cdot 10^4 [m^2 / ha] \cdot d [kg_{sol} / m^3]}$$

C_{sol} = Concentration initiale dans le sol [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = Dose appliquée [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = épaisseur de la couche de sol dans le champ [m]; d = densité en vrac du sol (matière sèche) [$kg \cdot m^{-3}$].

Grosso modo, l'application d'une dose de $1 kg \cdot ha^{-1}$ donne une concentration dans le sol de $1 mg \cdot kg^{-1}$ sur une couche de 10 cm (en supposant que la densité en vrac s'élève à $1 g \cdot cm^{-3}$).

Prélèvements et mesures

46. L'expérimentateur retire deux flacons d'incubation à l'issue d'intervalles de temps appropriés et extrait les échantillons de sol avec des solvants adéquats de polarité différente afin de doser la substance d'essai et/ou les produits de transformation. Un protocole bien conçu prévoit suffisamment de flacons pour que deux flacons puissent être retirés à chaque prélèvement d'échantillons. On prélève également les solutions et les solides d'absorption à différents intervalles (intervalles de 7 jours durant le premier mois et de 14 jours par la suite) pendant et à la fin de l'incubation de chaque échantillon de sol pour y détecter la présence éventuelle de produits volatils. L'étude doit comporter au moins 5 points (dans le temps) de prélèvement, en plus du prélèvement d'un l'échantillon de sol qui a lieu juste après l'application (échantillon au jour 0). Il faudrait choisir les intervalles de temps de telle sorte qu'on puisse établir la courbe de déclin de la substance d'essai et les courbes de formation et de déclin des produits de transformation (p. ex. jours 0, 1, 3, 7 ; semaines 2, 3 ; mois 1, 2, 3, etc).

47. Si la substance d'essai est marquée au ^{14}C , la radioactivité non extractible est quantifiée par combustion et un bilan massique est calculé pour chaque intervalle de prélèvement.

48. Dans le cas de l'incubation en anaérobiose et de l'incubation des sols de rizières, on analyse les deux phases (sol et eau) en même temps pour doser la substance d'essai et les produits de transformation, ou on sépare ces dernières par filtration ou centrifugation avant de les extraire afin de les analyser.

Essais facultatifs

49. Il peut être utile de pratiquer des études dans des conditions d'aérobiose non stériles à d'autres températures et à d'autres teneurs en eau du sol pour estimer l'influence de la température et de la teneur en eau du sol sur les vitesses de transformation de la substance d'essai et/ou de ses produits de transformation dans le sol.

50. Une caractérisation supplémentaire de la radioactivité non extractible peut être tentée, par exemple par extraction dans un fluide supercritique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

51. Les quantités de la substance d'essai, des produits de transformation, des substances volatiles (en pourcentage uniquement) et de la radioactivité non extractible doivent être libellés en pourcentage de la quantité initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de sol (en fonction du poids sec du sol) pour chaque intervalle de prélèvement. Le bilan massique doit être donné en pourcentage de la quantité initiale appliquée pour chaque intervalle de prélèvement. Un graphique des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permettra d'estimer sa demi-vie de transformation ou le TD_{50} . Il convient d'identifier les principaux produits de transformation et de tracer la courbe de leurs concentrations en fonction du temps pour montrer leurs vitesses de formation et de disparition. Un produit de transformation est considéré comme principal dès lors que sa concentration est supérieure ou égale à 10 pour cent de la dose appliquée, à n'importe quel moment de l'étude.

52. Les produits volatils piégés donnent une certaine indication de la volatilité d'une substance d'essai et de ses produits de transformation dans le sol.

53. Il faudrait effectuer des déterminations plus précises des demi-vies ou du TD₅₀ et, si nécessaire, du TD₇₅ et du TD₉₀, selon des modèles cinétiques appropriés. Les valeurs de la demi-vie et du TD₅₀ doivent être rapportées avec une description du modèle utilisé, l'ordre de la cinétique et le coefficient de détermination (r^2). La cinétique de premier ordre est préférable tant que r^2 demeure supérieur à 0,7. Les calculs doivent aussi s'appliquer, le cas échéant, aux principaux produits de transformation. Les références 27 à 31 donnent des exemples de modèles appropriés.

54. Dans le cas des études de vitesse conduites à différentes températures, les vitesses de transformation doivent être décrites en fonction de la température, dans la gamme des températures expérimentales, selon la relation d'Arrhénius formulée comme suit :

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ ou } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

où $\ln A$ et B sont les constantes de régression respectives d'ordonnées à l'origine et de la pente, d'une courbe ajustée au mieux, formée par la régression linéaire de $\ln k$ en $1/T$, k étant la constante de vitesse à température T et T la température en degrés Kelvin. Il faut tenir compte de la gamme limitée de températures dans laquelle la relation d'Arrhénius est valable, lorsque la transformation est gouvernée par l'action microbiologique.

Rapport d'essai

55. Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nom courant, nom chimique, numéro du CAS, formule développée (indiquant la position du marqueur dans la molécule, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir au paragraphe 7) ;
- pureté (impuretés) de la substance d'essai ;
- pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (s'il y a lieu) ;

Substances de référence :

- nom chimique et structure des substances de référence employées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation.

Sols testés :

- informations précises sur le lieu de prélèvement ;
- date et méthode de prélèvement du sol ;
- propriétés des sols telles que pH, teneur en carbone organique, texture (pourcentages de sable, de limon et d'argile), capacité d'échange cationique, densité en vrac, rétention d'eau et biomasse microbienne ;
- durée et conditions de stockage du sol (le cas échéant) ;

Conditions d'essai :

- dates de la réalisation des études ;
- quantité de substance d'essai appliquée ;
- solvants employés et méthode d'application de la substance d'essai ;

- poids du sol traité au départ et des prélèvements effectués à chaque intervalle pour analyse ;
- description du système d'incubation utilisé ;
- débits d'air (pour les systèmes dynamiques uniquement) ;
- température du dispositif expérimental ;
- teneur en eau du sol durant l'incubation ;
- biomasse microbienne au début, pendant et à la fin des études en aérobiose ;
- pH, concentration d'oxygène, et potentiel rédox au début, pendant et à la fin des études en anaérobiose et des études de sols à paddy ;
- méthode(s) d'extraction ;
- méthodes pour quantifier et identifier la substance d'essai et les produits de transformation dans le sol et les matériaux d'absorption ;
- nombre d'exemplaires testés et de témoins.

Résultats :

- résultat de la détermination de l'activité microbiologique ;
- répétabilité et sensibilité des méthodes d'analyse employées ;
- pourcentages de récupération (les pourcentages qui indiquent qu'une l'étude est valable sont donnés au paragraphe 12) ;
- tableaux des résultats exprimés en pourcentage de la dose appliquée initialement et, s'il y a lieu, en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de sol (en poids sec) ;
- bilan massique pendant et à la fin des études ;
- caractérisation de la radioactivité non extractible (liée) ou des résidus fixés dans le sol ;
- quantification du dégagement de CO_2 des autres produits volatils ;
- courbes de la concentration de la substance d'essai (et des principaux produits de transformation, le cas échéant) dans le sol en fonction du temps ;
- demi-vie ou TD_{50} , TD_{75} et TD_{90} de la substance d'essai et des principaux produits de transformation, le cas échéant, et intervalles de confiance ;
- estimation de la vitesse de dégradation non biologique dans des conditions stériles ;
- évaluation de la cinétique de transformation pour la substance d'essai et, s'il y a lieu, pour les principaux produits de transformation ;
- voies de transformation proposées, le cas échéant ;
- interprétation des résultats ;
- données brutes (chromatogrammes des échantillons, calculs des vitesses de transformation dans les échantillons et moyens utilisés pour identifier les produits de transformation).

Interprétation et évaluation des résultats

56. Bien que les études soient pratiquées dans des systèmes artificiels de laboratoire, les résultats permettront d'estimer la vitesse de transformation de la substance d'essai et le rythme de formation et de disparition des produits de transformation sur le terrain (33)(34).

57. Une étude de la voie de transformation d'une substance d'essai livre des informations sur la façon dont la substance appliquée subit une modification structurelle dans le sol, induite par des réactions chimiques et microbiologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada ; chimie et devenir dans l'environnement.
- (3) Union européenne (UE) (1995). Directive 95/36/CE de la Commission du 14 juillet 1995 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe II, partie A et Annexe III, partie A : Devenir et comportement dans l'environnement.
- (4) Dutch Commission for Registration of pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Qualité du sol. Lignes directrices relatives aux essais en laboratoire pour la biodégradation de produits chimiques organiques dans le sol sous conditions aérobies.
- (7) ISO 14239 (1997). Qualité du sol. Méthodes de mesure de la minéralisation de produits chimiques organiques dans le sol sous conditions aérobies, au moyen de systèmes d'incubation de laboratoire.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF - Japan (2000). Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - *Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded)*.
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) ISO 10381-6 (1993). Qualité du sol – Échantillonnage – Partie 6 : Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation de sols destinés à une étude en laboratoire des processus microbiens aérobies.
- (13) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OCDE (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (15) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

- (16) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (17) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (18) Compendium de normes ISO. Environnement. Qualité du sol – Aspects généraux ; méthodes d'analyse chimiques et physiques ; méthodes d'analyse biologiques. Première édition, 1994.
- (19) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (20) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (21) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221.
- (22) ISO 14240-1 et 2 (1997). Qualité du sol. Détermination de la biomasse microbienne du sol – Partie 1 : Méthode par respiration induite par le substrat. Partie 2 : Méthode par fumigation-extraction.
- (23) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (24) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59-63 (SETAC-Europe).
- (25) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68-69 (SETAC-Europe).
- (26) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197-200.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105-120.
- (28) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141-146.
- (29) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. *Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides*, 181-199.
- (30) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
- (31) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer* 39, 188-204.

- (32) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 33, 47-60.
- (33) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.
- (34) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Substance d'essai : le produit parent et ses produits de transformation pertinents.

Produits de transformation : toutes les substances issues des réactions de transformation biologiques et non biologiques de la substance d'essai, y compris le CO₂ et les résidus fixés.

Résidus fixés : les "résidus fixés" sont les substances présentes dans le sol, les plantes ou les animaux, qui subsistent dans la matrice sous la forme du produit parent ou de ses métabolites et produits de transformation, après l'extraction. La méthode d'extraction ne doit pas trop altérer les produits ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être en partie élucidée par des méthodes d'extraction modifiant la matrice et des techniques d'analyse complexes. À ce jour, par exemple, les liaisons ioniques covalentes et les liaisons de sorption, de même que le piégeage d'une molécule, ont été identifiés de cette manière.

En général, la formation de résidus fixés diminue sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (1) [d'après UICPA 1984 (2)].

Transformation aérobie : réactions ayant lieu en présence d'oxygène moléculaire (3).

Transformation anaérobie : réactions ayant lieu en l'absence d'oxygène moléculaire (3).

Sol : mélange de substances minérales et organiques, ces dernières comprenant des espèces de poids moléculaire élevé à forte proportion de carbone et d'azote, animé par de petits (essentiellement micro-) organismes. Le sol peut être traité dans deux états :

- (a) intact, tel qu'il résulte de son évolution dans le temps, avec différentes couches caractéristiques du type de sol ;
- (b) remué, tel qu'il est habituellement dans les champs cultivés ou comme cela se produit lorsque les échantillons sont prélevés par creusement et traités selon cette Ligne directrice (3).

Minéralisation : dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et H₂O en aérobiose, et en CH₄, CO₂ et H₂O en anaérobiose. Dans le cadre de cette Ligne directrice, lorsqu'on utilise un produit marqué au ¹⁴C, la minéralisation consiste en une dégradation poussée d'une molécule au cours de laquelle l'atome de carbone radioactif est oxydé en ¹⁴CO₂ (3).

Demi-vie, t_{0,5} : temps nécessaire à la transformation de 50 pour cent d'une substance d'essai lorsque la transformation obéit à une cinétique de premier ordre ; elle est indépendante de la concentration.

-
- (1) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
 - (2) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
 - (3) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : 304 A : Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

ANNEXE 1 (suite)

TD₅₀ (Temps de disparition 50) est la durée correspondant à une diminution de 50 pour cent de la concentration de la substance d'essai ; il diffère de la demi-vie $t_{0.5}$ lorsque la transformation n'est pas régie par une cinétique de premier ordre.

TD₇₅ (Temps de disparition 75) est la durée correspondant à une diminution de 75 pour cent de la concentration de la substance d'essai.

TD₉₀ (Temps de disparition 90) est la durée correspondant à une diminution de 90 pour cent de la concentration de la substance d'essai.

ANNEXE 2PRESSION D'ASPIRATION D'EAU, CAPACITÉ AU CHAMP ET
CAPACITÉ DE RÉTENTION D'EAU (1)

Hauteur d'une colonne d'eau [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Remarques
10 ⁷	7	10 ⁴	Sol sec
1.6 · 10 ⁴	4,2	16	Point de flétrissement
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	} Gamme de capacités au champ ^(d)
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Capacité de rétention d'eau (approximation)
1	0	0,001	Sol saturé en eau

(a) pF = log de la hauteur d'une colonne d'eau exprimée en cm.

(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

(c) Correspond à une teneur en eau approximative de 10 pour cent dans le sable, 35 pour cent dans le limon et 45 pour cent dans l'argile.

(d) La capacité au champ n'est pas constante, mais varie en fonction du type de sol entre pF 1,5 et 2,5.

La pression d'aspiration d'eau se mesure en cm d'une colonne d'eau ou en bar. Compte tenu de la grande amplitude des valeurs de la pression d'aspiration, on l'exprime simplement par la valeur du pF, lequel équivaut au logarithme de la hauteur d'une colonne d'eau exprimée en cm.

La capacité au champ est la quantité d'eau qui peut être emmagasinée en s'opposant à la gravité par un sol naturel, 2 jours après une longue période de pluies ou après une irrigation suffisante. Elle est déterminée in situ dans des sols intacts. Cette mesure n'est donc pas applicable aux échantillons de sol remués étudiés en laboratoire. Les valeurs de la capacité au champ déterminées dans des sols remués peuvent montrer une grande variance systématique.

La capacité de rétention d'eau est déterminée en laboratoire sur un sol intact et un sol remué. Pour ce faire on sature en eau une colonne de sol par capillarité. Elle est particulièrement utile pour les sols remués et peut être jusqu'à 30 pour cent supérieure à la capacité au champ (1). Il est aussi plus facile de mesurer expérimentalement la capacité de rétention d'eau que d'obtenir des valeurs fiables pour la capacité au champ.

(1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

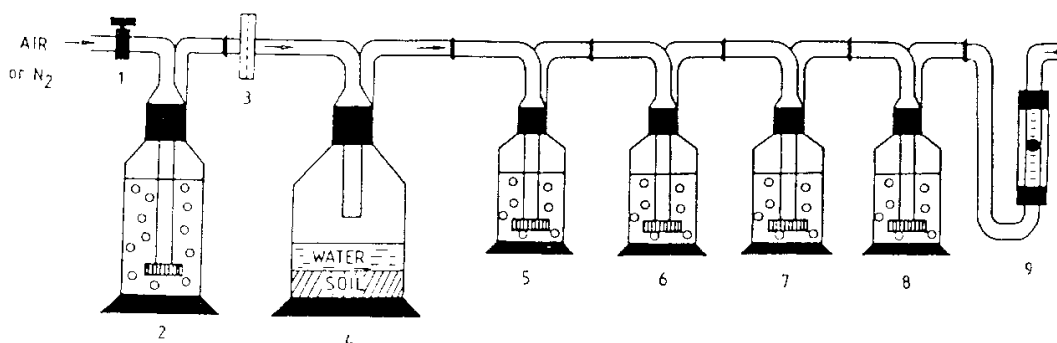
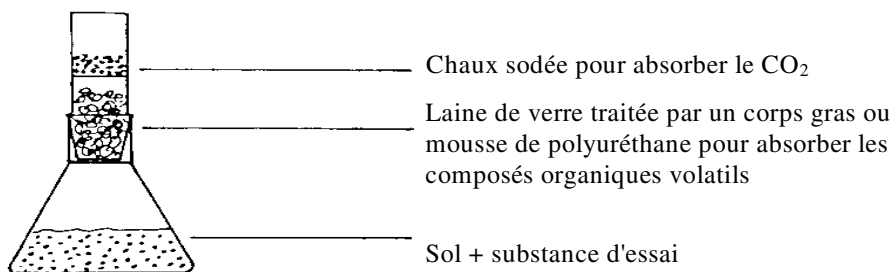
ANNEXE 3TENEUR EN EAU DE DIFFÉRENTS TYPES DE SOLS (g d'eau par 100 g de sol sec)
ISSUS DE PLUSIEURS PAYS

Type de sol	Pays	Teneur en eau à		
		CRE ¹	pF = 1,8	pF = 2,5
Sable	Allemagne	28,7	8,8	3,9
Sable limoneux	Allemagne	50,4	17,9	12,1
Sable limoneux	Suisse	44,0	35,3	9,2
Limon fin	Suisse	72,8	56,6	28,4
Limon argileux	Brésil	69,7	38,4	27,3
Limon argileux	Japon	74,4	57,8	31,4
Limon sableux	Japon	82,4	59,2	36,0
Limon fin	États-Unis	47,2	33,2	18,8
Limon sableux	États-Unis	40,4	25,2	13,3

¹ Capacité de rétention d'eau

ANNEXE 4Figure 1Exemple d'appareil dynamique pour étudier la transformation des produits chimiques dans le sol
(1)(2)

- 1 : robinet à pointeau
 2 : flacon contenant de l'eau pour le lavage des gaz
 3 : ultramembrane (conditions stériles uniquement), porosité : 0,2 µm
 4 : flacon contenant du sol au métabolisme actif (gorgé d'eau seulement en anaérobiose et pour les sols de rizières)
 5 : piège à éthylèneglycol pour les composés organiques volatils
 6 : piège à acide sulfurique pour les composés alcalins volatils
 7, 8 : piège à NaOH pour le CO₂ et d'autres composés acides volatils
 9 : débitmètre.

Figure 2Exemple de flacon biométrique pour étudier la transformation des produits chimiques dans le sol
(3)

- (1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
 (2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
 (3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.