

---

---

**Qualité du sol — Effets des polluants  
vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) —**

**Partie 1:**

Détermination de la toxicité aiguë en utilisant  
des substrats de sol artificiel

[ISO 11268-1:1993](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-92c9d52a4bb8/iso-11268-1-1993)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-92c9d52a4bb8/iso-11268-1-1993)

*Soil quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) —*

*Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*



## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 11268-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-93765376487/iso-11268-1-1993>

L'ISO 11268 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida)*:

- *Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel*
- *Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction*
- *Partie 3: Lignes directrices concernant les essais sur site*

Les annexes A et B de la présente partie de l'ISO 11268 sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1993

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

## Introduction

La présente partie de l'ISO 11268 décrivant une méthode utilisant un sol artificiel, a été élaborée en tenant compte des méthodes d'essai recommandées par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 11268-1:1993](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-92c9d52a4bb8/iso-11268-1-1993)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-92c9d52a4bb8/iso-11268-1-1993>

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 11268-1:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-92c9d52a4bb8/iso-11268-1-1993>

# Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) —

## Partie 1:

### Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel

#### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11268 prescrit une méthode de détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de *Eisenia fetida* après absorption cutanée et ingestion, en utilisant un substrat artificiel. Cette méthode ne s'applique pas aux substances volatiles, c'est-à-dire les substances pour lesquelles  $H$  (constante de Henry) ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à 1, ou pour lesquelles la pression de vapeur à 25 °C excède 0,013 3 Pa.

Elle ne tient pas compte de l'éventuelle dégradation de la substance expérimentée.

#### 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 11268. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 11268 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 11274:—<sup>1)</sup>, *Qualité du sol — Détermination de la caractéristique de la rétention d'eau — Méthodes de laboratoire.*

ISO 11461:—<sup>1)</sup>, *Qualité du sol — Détermination de la teneur en eau volumique du sol — Méthode gravimétrique.*

#### 3 Définitions

Pour les besoins de l'ISO 11268, les définitions suivantes s'appliquent.

**3.1 CL 50:** Concentration létale moyenne, c'est-à-dire la concentration de substance expérimentée initialement présente qui provoque la mort de 50 % des animaux soumis à l'essai pendant la période d'essai.

**3.2 CSEO (concentration sans effet observable):** Plus forte concentration de substance expérimentée pour laquelle aucun effet létal ou autre (tel qu'une modification de poids) n'est observé.

NOTE 1 CL 50 et CSEO sont exprimées en milligrammes de substance expérimentée par kilogramme de masse sèche de substrat d'essai (5.2).

#### 4 Principe

Le pourcentage de mortalité de lombriciens adultes (espèce *Eisenia fetida*) placés dans un substrat défini, contenant la substance expérimentée à différentes concentrations est déterminé au bout de 7 jours et

1) À publier.

14 jours. La substance expérimentée est ajoutée en une seule fois et l'essai est réalisé sans renouvellement de la substance.

Les résultats obtenus lors des essais sont comparés avec ceux d'un essai témoin et utilisés pour estimer la concentration qui provoque la mortalité de 50 % des lombriciens (CL 50, 14 jours).

NOTE 2 L'expérience a montré que la chloroacétamide est une substance de référence appropriée.

L'essai est conduit en deux étapes:

- un essai préliminaire qui donne une indication approximative des concentrations responsables de la mortalité totale et de l'absence de mortalité, et qui sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif;
- un essai définitif qui précise les concentrations provoquant entre 10 % et 90 % de mortalité, dont le résultat est le seul retenu.

Les substances ne sont pas expérimentées à des concentrations supérieures à 1 000 mg par kilogramme de substrat sec.

Si l'essai préliminaire ne provoque pas de mortalité, il n'est pas nécessaire de réaliser l'essai définitif.

## 5 Réactifs

### 5.1 Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué par des lombriciens adultes de l'espèce *Eisenia fetida*, âgés d'au moins deux mois, possédant un clitellum et dont la masse humide est comprise entre 300 mg et 600 mg.

NOTE 3 Il existe deux espèces d'*Eisenia fetida* que certains taxonomistes considèrent comme des espèces distinctes, *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*. Elles sont morphologiquement similaires mais l'une, appelée *E. fetida fetida* (*E. fetida*) comporte des bandes ou rayures transversales caractéristiques sur les segments, tandis que l'autre, appelée *E. fetida andrei* (*E. andrei*) en est dépourvue et présente une couleur diaprée rougeâtre. Les deux espèces peuvent être utilisées indifféremment.

Sélectionner les vers à utiliser pour l'essai de manière à obtenir, dans la mesure du possible, une population homogène du point de vue de la taille et du poids. Les laver à l'eau potable avant l'essai.

NOTE 4 Un exemple de technique d'élevage d'*Eisenia fetida* est indiqué dans l'annexe A.

### 5.2 Substrat d'essai

La quantité de substrat utilisé par récipient d'essai (6.1) doit être équivalente à 500 g de matière sèche.

Le substrat appelé «sol artificiel» doit avoir la composition suivante:

#### Pourcentage exprimé en masse sèche

Sphaigne finement moulue, exempte de tout résidu de plante visible	10 %
Argile kaolinique, contenant plus de 30 % de kaolinite	20 %
Sable de quartz industriel (sable fin dominant dont plus de 50 % des grains présentent une granulométrie de 0,05 mm à 0,2 mm)	70 %

Ajouter du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) pulvérisé, de qualité analytique reconnue, en quantité suffisante pour amener le pH du substrat humidifié à  $6,0 \pm 0,5$  (généralement environ 0,5 % de la masse des ingrédients secs.)

Le substrat doit être humidifié avec de l'eau déionisée ou distillée jusqu'à 40 % à 60 % de sa capacité de rétention d'eau totale, déterminée conformément à l'ISO 11274.

Déterminer la teneur en eau du substrat conformément à l'ISO 11461.

NOTE 5 Il convient de permettre d'utiliser tout type d'eau pour introduire la substance d'essai dans le sol.

## 6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et

**6.1 Récipients en verre**, un pour chaque essai, de capacité comprise entre 1 litre et 2 litres, non hermétiquement fermés de manière à permettre des échanges entre le milieu et l'atmosphère.

**6.2 Dispositif**, permettant de mesurer la masse sèche du substrat conformément à l'ISO 11461.

## 7 Environnement de l'essai

**7.1 Enceinte**, thermostatée à la température de  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**7.2 Source lumineuse** (par exemple, tubes fluorescents blancs), permettant de soumettre les récipients à une intensité lumineuse constante de 400 lx à 800 lx sous un cycle contrôlé lumière/obscurité compris entre 12 h: 12 h et 16 h: 8 h.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation de l'essai

Les concentrations de substance expérimentée doivent être exprimées en masse de substance par la masse sèche du substrat de sol (mg/kg) (voir 5.2).

#### 8.1.1 Introduction des substances expérimentées

##### 8.1.1.1 Substances solubles dans l'eau

Immédiatement avant le début de l'essai, dissoudre la quantité de substance expérimentée dans l'eau nécessaire aux répétitions d'une concentration dans l'eau [ou dans une partie de l'eau utilisée pour humidifier le substrat (voir 5.2)] et homogénéiser soigneusement avec le substrat d'essai avant introduction dans le récipient en verre (6.1).

Poursuivre l'essai comme spécifié en 8.1.2.

##### 8.1.1.2 Substances non solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques

Dissoudre dans un solvant volatil (par exemple, acétone ou hexane) la quantité de substance expérimentée nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée.

Verser la solution ainsi obtenue dans un récipient en verre (6.1) contenant le substrat de sol (5.2). Homogénéiser soigneusement et évaporer le solvant en plaçant le récipient sous une hotte aspirante. Ajouter ensuite l'eau (voir 5.2). Homogénéiser soigneusement l'ensemble et poursuivre comme spécifié en 8.1.2.

**AVERTISSEMENT — Compte tenu des vapeurs de solvant, il convient de prendre des précautions appropriées afin d'éviter les dangers d'inhalation ou d'explosion ou l'endommagement de l'équipement d'extraction, des pompes, etc.**

##### 8.1.1.3 Substances insolubles dans l'eau ou dans les solvants organiques

Dans le cas d'une substance insoluble dans un solvant volatil, préparer un mélange de 10 g de sable de quartz industriel finement moulu (voir 5.2) et de la quantité de substance expérimentée nécessaire pour

obtenir la concentration souhaitée. Placer ce mélange, le reste de substrat de sol (voir 5.2) et l'eau (voir 5.2) dans le récipient d'essai (voir 6.1).

Homogénéiser soigneusement l'ensemble et poursuivre comme spécifié en 8.1.2.

#### 8.1.2 Introduction du réactif biologique

Déterminer la teneur en eau et le pH du sol artificiel au début et à la fin de l'essai (lorsque l'essai est réalisé avec des substances acides ou basiques, ne pas ajuster le pH).

Prélever 10 vers sur la quantité préparée conformément à 5.1, les sécher sur du papier absorbant, les peser et les introduire dans le récipient d'essai.

Couvrir le récipient comme indiqué en 6.1 et le placer dans l'enceinte d'essai (voir 7.1).

#### 8.1.3 Récipient témoin

Préparer les récipients témoins de la même manière que les récipients d'essai. Si la préparation de l'essai nécessite l'emploi d'un solvant (voir 8.1.1.2), utiliser un récipient témoin supplémentaire contenant le solvant mais sans la substance expérimentée. Couvrir les récipients comme indiqué en 6.1.

#### 8.2 Essai préliminaire

Effectuer un essai préliminaire pour 5 concentrations de la substance expérimentée [par exemple: 0,1 mg/kg; 1 mg/kg; 10 mg/kg; 100 mg/kg et 1 000 mg/kg, les concentrations étant exprimées en milligrammes de substance expérimentée par kilogramme de substrat de sol sec (5.2)] et pour le témoin en utilisant 10 vers par concentration et par récipient.

Préparer les récipients d'essai selon les indications de 8.1.1 et 8.1.2.

Placer les récipients d'essai dans l'environnement d'essai décrit à l'article 7.

Au bout de 7 jours, compter les vers vivants et, le cas échéant, retirer les vers morts.

Au bout de 14 jours, compter les vers vivants et les vers morts dans chaque récipient (un vers est considéré comme mort lorsqu'il ne présente aucune réaction à une piqûre d'épingle appliquée sur sa partie antérieure).

Calculer le pourcentage de mortalité pour chaque récipient et chaque concentration. Noter les symptômes observés sur les animaux.

### 8.3 Essai définitif

À partir des résultats de l'essai préliminaire, effectuer l'essai définitif sur 5 concentrations de la substance expérimentée, se situant en progression géométrique entre la plus forte concentration ne produisant aucune mortalité et la plus faible concentration produisant une mortalité totale.

Procéder simultanément à quatre répétitions par concentration et à un essai témoin sans la substance expérimentée (voir 8.1.3) et, si nécessaire, avec un témoin contenant le solvant, et en plaçant chaque récipient dans l'environnement d'essai (article 7). Au cours de la période d'essai et au bout de 14 jours, procéder comme indiqué en 8.2.

À la fin de l'essai, déterminer le nombre total et la masse de vers vivants pour chaque récipient, la teneur en eau d'un récipient témoin et le pH pour chaque concentration d'essai.

### 8.4 Substance de référence

Conduire l'essai avec la chloroacétamide de qualité analytique, conformément au mode opératoire décrit en 8.1.1.1.

NOTE 6 Il convient que la CL 50 se situe entre 20 mg/kg et 80 mg/kg.

## 9 Calcul et expression des résultats

### 9.1 Calcul

Pour chaque concentration, déterminer le pourcentage de mortalité obtenu lors de l'essai définitif.

NOTE 7 Lorsque les données sont adéquates, il convient de déterminer la CL 50-14 jours et les limites de confiance ( $T = 0,95$ ) selon des méthodes normalisées (Méthode de Litchfield et Wilcoxon<sup>[6]</sup> ou toute méthode équivalente; voir annexe B).

Si deux concentrations consécutives dans un rapport inférieur ou égal à 1,8 (par exemple 10, 18) donnent d'une part 0 % et d'autre part, 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer le domaine dans lequel se situe la CL 50.

### 9.2 Expression des résultats

Indiquer, en milligrammes par kilogramme de substrat de sol sec, la CL 50-14 jours (ou plus, si l'essai est poursuivi au-delà de cette période — voir article 9), la

plus forte concentration expérimentée provoquant 0 % de mortalité et la plus faible concentration expérimentée provoquant 100 % de mortalité.

## 10 Validité de l'essai

Les résultats sont considérés comme valables si

le pourcentage de mortalité observé dans le témoin est inférieur à 10 %;

la perte moyenne en biomasse des vers dans les témoins ne dépasse pas 20 %.

## 11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les indications suivantes:

- a) la référence à la présente partie de l'ISO 11268;
- b) les résultats exprimés comme en 9.2;
- c) la description complète de réactif biologique utilisé (espèce, âge, gamme de poids, conditions d'élevage, fournisseur);
- d) le mode de préparation du substrat d'essai, avec indication du solvant utilisé en cas de substance non soluble dans l'eau;
- e) la nature de la substance de référence et les résultats obtenus lors de son utilisation;
- f) les conditions de l'environnement de l'essai;
- g) la méthode utilisée pour le calcul de la CL 50;
- h) un tableau indiquant le pourcentage de mortalité obtenu dans chaque récipient, pour chaque concentration et lors de l'essai témoin;
- i) la masse de vers vivants à la fin de l'essai;
- j) si cette donnée est disponible, la plus forte concentration ne causant aucun effet observable (CSEO);
- k) la description des symptômes évidents ou pathologiques, ou des modifications sensibles du comportement, observés sur les organismes soumis aux essais;
- l) la teneur en eau et le pH du sol artificiel au début et à la fin de l'essai;

m) tous les détails opératoires non prévus dans la présente partie de l'ISO 11268 et tous les inci-

dents susceptibles d'avoir eu une influence sur les résultats;

n) un graphe de la courbe concentration/réponse.

## **iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)**

ISO 11268-1:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8d9264f8-4a69-4b6b-8a48-92c9d52a4bb8/iso-11268-1-1993>