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

Partie 2:

Détermination des effets sur la reproduction

*Soil quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) —
Part 2: Determination of effects on reproduction*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11268-2:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f1/iso-11268-2-1998>



Sommaire

	Page
1	1
2	1
3	2
4	2
5	3
6	4
7	5
8	6
9	7
10	7

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Annexes

A	9
B	10
C	11
D	12
E	13
F	15
G	18

© ISO 1998

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

Internet central@iso.ch

X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

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 11268-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

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 effets sur site*

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11268-2:1998
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f9/iso-11268-2-1998>

Introduction

La présente partie de l'ISO 11268 décrit une méthode permettant d'expérimenter les effets des produits chimiques sur la reproduction et la mortalité des vers de terre dans un sol artificiel. Elle peut également être adaptée pour expérimenter ou comparer les sols, dans le but, par exemple, d'évaluer l'effet de leur traitement ainsi que les effets sublétaux et les niveaux sans effet des pesticides ou de tous autres produits chimiques ajoutés.

La présente partie de l'ISO 11268 a été élaborée en tenant compte des méthodes d'essai recommandées par l'Organisation de coopération pour le développement économique et par l'Union européenne (voir références dans l'annexe G).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 11268-2:1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f1/iso-11268-2-1998)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f1/iso-11268-2-1998>

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

Partie 2:

Détermination des effets sur la reproduction

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11268 décrit une méthode de détermination des effets de certaines substances sur la reproduction, la mortalité et la croissance des *Eisenia fetida fetida* et *Eisenia fetida andrei* par absorption cutanée ou orale, à l'aide d'un substrat de sol artificiel.

La méthode n'est pas applicable aux substances volatiles, c'est-à-dire les substances pour lesquelles H (la constante de Henry) ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à 1, ou encore pour lesquelles la pression de vapeur est supérieure à 0,013 3 Pa à 25 °C.

NOTE 1 Cette méthode d'essai n'a prévu aucune disposition particulière visant à surveiller la stabilité de la substance soumise à l'essai.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234329d5173/iso-11268-2-1998>

NOTE 2 Les recommandations concernant l'adaptation de cette méthode à la comparaison ou à la surveillance de la qualité des sols, ou à l'agriculture, pour évaluer par exemple les effets des pesticides, sont données dans les annexes D et E.

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 10390:1994,	<i>Qualité du sol — Détermination du pH</i>
ISO 11268-1:1993,	<i>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</i>
ISO 11274:— ¹⁾ ,	<i>Qualité du sol — Détermination des caractéristiques de la rétention d'eau — Méthodes de laboratoire</i>
ISO 11465:1993,	<i>Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique</i>

¹⁾ À publier.

3 Définitions

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

3.1

croissance

augmentation de la biomasse, c'est-à-dire la masse fraîche des organismes exprimée en pourcentage de la masse fraîche des organismes au début de l'essai

3.2

reproduction

augmentation du nombre moyen de larves écloses des cocons par récipient d'essai après huit semaines d'incubation dans des conditions spécifiées pour l'essai

3.3

taux de reproduction

nombre moyen de larves écloses des cocons et ayant survécu jusqu'à la fin de la période d'essai, par ver adulte encore vivant après quatre semaines

3.3

concentration la plus faible ayant un effet observé

LOEC

concentration la plus faible de la substance à expérimenter à laquelle un effet significatif a été observé par comparaison avec l'échantillon témoin, exprimée en masse de la substance expérimentée par masse sèche du substrat d'essai

[ISO 11268-2:1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f1/iso-11268-2-1998)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f1/iso-11268-2-1998>

3.4

concentration sans effet observé

NOEC

concentration d'essai la plus élevée d'une substance expérimentée à laquelle aucun effet léthal ou autre (une diminution de la masse par exemple) n'a été observé, exprimée en masse de la substance expérimentée par masse sèche du substrat d'essai

3.5

CE50

concentration estimée pour avoir un effet inhibiteur de 50 % sur le taux de reproduction, à la fin de l'essai, par comparaison avec le témoin, exprimée en masse de la substance expérimentée par masse sèche du substrat d'essai

4 Principe

On détermine les effets sur la croissance et la reproduction, ainsi que le pourcentage de mortalité des vers de terre adultes (espèce *Eisenia fetida fetida* ou *E. fetida andrei*) placés dans un substrat de sol artificiel défini contenant la substance d'essai à diverses concentrations. La substance d'essai est ajoutée en une seule fois. Les effets sur la mortalité et la biomasse sont déterminés après quatre semaines. L'effet sur la reproduction est mesuré en comptant le nombre de larves écloses des cocons après quatre autres semaines.

Toutes les concentrations d'essai supérieures à la LOEC doivent avoir un effet nuisible supérieur ou égal à celui de la LOEC. Lorsqu'on ne connaît pas la concentration à laquelle la substance étudiée est susceptible de produire un effet, il est utile de conduire l'essai en deux étapes:

- un essai préliminaire de toxicité aiguë, comme décrit dans l'ISO 11268-1, qui donne une indication de la concentration produisant un effet et de la concentration responsable de la mortalité totale. Les concentrations pour l'essai définitif peuvent alors être retenues;
- un essai définitif sur la reproduction pour déterminer la concentration d'un produit chimique qui, lorsqu'il est uniformément réparti dans le sol artificiel, n'a pas d'effet significatif sur le nombre de larves écloses des cocons comparé au témoin (NOEC) et la plus faible concentration produisant un effet (LOEC).

5 Réactifs

5.1 Réactif biologique

Le réactif biologique est constitué de vers de terre adultes de l'espèce *Eisenia fetida fetida* ou *Eisenia fetida andrei* (voir références données à l'annexe G) âgés de deux mois à 1 an, possédant un clitellum, et une masse humide comprise entre 300 mg et 600 mg.

Les vers à utiliser doivent être choisis dans un élevage synchrone pour former une population aussi homogène que possible du point de vue de la taille, de l'âge et de la masse. L'âge des vers ne doit pas varier de plus de quatre semaines.

La synchronisation de l'élevage s'obtient en plaçant des vers adultes dans des récipients d'élevage (voir annexe A) et en les retirant quatre semaines après, au plus tard. Les larves des cocons restants atteignent l'âge adulte au bout de deux mois au moins.

Conditionner avant l'emploi les vers sélectionnés dans un sol artificiel, pendant 1 j à 7 j. La nourriture, qui est également utilisée comme source d'alimentation dans le cadre de l'essai (voir 5.3), doit être dispensée en quantité suffisante (voir 5.2.1).

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.itech.ai)
ISO 11268-2:1998
<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/9b0ffe58-e2da-4e4f-a6a3-234330d5d7f1/iso-11268-2-1998>

5.2 Substrat d'essai

5.2.1 Substrat de sol

Le substrat utiliser pour la préparation du sol artificiel (5.2.2) doit avoir la composition suivante:

Composant du sol artificiel	En pourcentage de la masse sèche
Tourbe de sphaignes séchée à l'air, finement moulue, exempte de tout résidu végétal visible	10 %
Argile kaolinique (séchée à l'air), contenant au moins 30 % de kaolinite	20 %
Sable de quartz industriel (séché à l'air), (contenant en majorité du sable fin, constitué à plus de 50 % en masse de grains dans la classe granulométrie de 0,05 mm à 0,2 mm), en fonction du CaCO ₃ nécessaire.	70 %

Avant l'expérience, le substrat soumis à l'essai doit être mélangé à la nourriture. S'il s'agit de bouse de vache séchée (voir 5.3), la quantité recommandée est de 5 g par 500 g de sol en masse sèche.

Ajouter une quantité suffisante (environ 0,5 %) de carbonate de calcium (CaCO₃), pulvérisé, de qualité analytique reconnue, pour amener le pH du substrat humidifié à 6,0 ± 0,5 au début de l'essai.

NOTE La quantité de carbonate de calcium nécessaire va dépendre des constituants du substrat de sol, nourriture comprise. Il convient qu'elle soit déterminée par des mesurages effectués sur des sous échantillons immédiatement avant l'essai.

La masse du substrat de sol utilisée pour fabriquer le sol artificiel doit être de 500 g à 600 g en masse sèche par récipient d'essai (6.1).

5.2.2 Sol artificiel

Préparer le sol artificiel en humidifiant le substrat de sol (5.2.1) avec de l'eau déionisée ou distillée pour atteindre une teneur en eau comprise entre 40 % et 60 % en masse de la capacité totale de rétention en eau, déterminée conformément à l'ISO 11274.

NOTE Il convient que le degré d'humidification du sol artificiel ne dépasse pas le degré au delà duquel de l'eau stagnante ou libre apparaîtrait à la compression. En attendant la publication de l'ISO 11274, l'annexe C propose une méthode permettant de déterminer la capacité de rétention en eau.

Immédiatement au début et à la fin de l'essai, déterminer la teneur en eau et le pH (conformément à l'ISO 11465 et à l'ISO 10390) en présence de KCl à 1 mol/l, dans un échantillon témoin et dans un échantillon de chacune des concentrations expérimentées (lorsque les essais portent sur des substances acides ou basiques, ne pas ajuster le pH).

5.3 Alimentation

Utiliser tout régime alimentaire dont on a démontré que la qualité permet, au minimum, le maintien à un niveau constant de la population des vers de terre.

NOTE Pour obtenir une reproduction suffisante, il est essentiel de nourrir les vers de terre pendant l'expérience. La bouse de vache séchée à l'air finement moulue s'est avérée appropriée. Il est recommandé d'effectuer des essais sur chaque ration de nourriture afin de vérifier que les vers de terre s'en nourrissent sans effet négatif (du, par exemple, à la présence d'ammoniaque ou de tout autre additif potentiellement nuisible). Il convient que la croissance et la production de cocons ne diminuent pas par rapport à celles de vers élevés dans un substrat sans nourriture (les conditions sont décrites dans l'ISO 11268-1).

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et:

6.1 Récipients, de capacité comprise entre 1 l et 2 l, dont la section transversale mesure environ 200 cm² de sorte qu'à une profondeur de 5 cm à 6 cm de substrat de sol corresponde une masse sèche de 500 g à 600 g. Les récipients pour essai doivent permettre des échanges gazeux entre le milieu et l'atmosphère, ainsi que le passage de la lumière (par exemple, au moyen d'un couvercle transparent perforé). Ils doivent être conçus de manière à empêcher les vers de terre de s'échapper (en fixant le couvercle à l'aide de ruban adhésif, par exemple).

6.2 Appareil pouvant mesurer le pH et la teneur en eau d'un substrat.

6.3 Environnement de l'essai

6.3.1 Enceinte thermostatée à 20 °C ± 2 °C.

6.3.2 Source lumineuse, permettant de fournir un éclairage constant de 400 lx à 800 lx sur le récipient, réglé pour un cycle lumière/obscurité compris entre 12h/12 h et 16h/8 h.

7 Mode opératoire

7.1 Essai préliminaire

S'il est nécessaire de déterminer la gamme des concentrations à utiliser lors de l'essai définitif, effectuer un essai préliminaire conformément à l'ISO 11268-1 pour quatre concentrations de la substance d'essai et un témoin [par exemple: 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg et 1 000 mg/kg, les concentrations étant exprimées en milligrammes de substance d'essai par kilogramme de substrat de sol séché (5.2.1)] sur 10 vers par concentration et par récipient.

7.2 Essai définitif

7.2.1 Introduction des substances d'essai

Choisir, selon le cas, la méthode a), b) ou c).

a) Substances solubles dans l'eau

Immédiatement avant le début de l'essai, dissoudre une quantité de la substance d'essai dans une quantité d'eau suffisante pour effectuer des répétitions d'une concentration dans l'eau (ou la quantité nécessaire pour humidifier le substrat de sol) de façon à satisfaire aux exigences de 5.2.2, puis la mélanger soigneusement avec le substrat d'essai avant d'introduire le tout dans un récipient d'essai.

b) Substances insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques

Dissoudre dans un solvant volatil (tel que l'acétone ou l'hexane) la quantité de substance à expérimenter nécessaire pour obtenir la concentration désirée, et la mélanger avec la quantité nécessaire de sable de quartz. Après avoir évaporé le solvant en installant le récipient sous une hotte aspirante, ajouter le reste du substrat de base et l'eau et mélanger soigneusement le tout avant de l'introduire dans les récipients d'essai. Continuer la procédure comme décrite en 7.2.3.

NOTE Pour disperser une substance peu soluble, il est possible d'avoir recours aux ultrasons, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants. Si tel est le cas, il convient que les concentrations soumises à l'essai contiennent la même quantité minimale de substance auxiliaire. Il convient également d'effectuer un autre témoin.

AVERTISSEMENT: Les vapeurs de solvant imposent que l'on prenne des précautions appropriées pour éviter les risques d'inhalation ou d'explosion, ou d'endommager le matériel pour extraction, les pompes, etc.

c) Substances insolubles dans l'eau ou dans les solvants organiques

Pour une substance insoluble dans un solvant volatil, préparer un mélange de 10 g de sable de quartz industriel finement moulu (voir 5.2.1) et la quantité de substance d'essai nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée. Placer le mélange, le reste du substrat de sol (5.2.1) et l'eau dans un récipient d'essai (6.1) et mélanger soigneusement.

Mélanger la substance d'essai au substrat de sol artificiel conformément à l'ISO 11268-1 avant d'ajouter les vers de terre.

Les concentrations permettant d'obtenir la LOEC/NOEC sont choisies sur la base des résultats de l'essai préliminaire. Les concentrations doivent être espacées par un facteur inférieur ou égal à 2.

Il n'est pas nécessaire de soumettre à l'essai les substances mélangées au substrat à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg de substrat d'essai.

Effectuer l'essai simultanément sur, au moins, quatre réplicats par concentration et sur un témoin.

7.2.2 Récipient témoin

Préparer des récipients témoins de la même manière que les récipients d'essai mais sans la substance à expérimenter. Si la préparation de l'essai implique l'utilisation de substances auxiliaires (voir 8.2.1), utiliser des récipients témoins supplémentaires, analogues aux récipients d'essai mais ne contenant pas la substance d'essai. Traiter ces récipients de la même manière que les récipients ne contenant pas la substance d'essai.

7.2.3 Ajout du réactif biologique

Pour chaque récipient d'essai ainsi que pour le récipient témoin, préparer, laver et essuyer (à l'aide de papier absorbant) 10 vers (5.1). Pour éviter les erreurs systématiques dans la répartition des vers dans les récipients pour essai, l'homogénéité de la population d'essai doit être déterminée en pesant un échantillon de vingt vers individuellement. L'homogénéité ayant été vérifiée, choisir des lots de 10 vers, les peser et les placer dans chaque récipient d'essai. Les lots de vers doivent être placés dans les récipients de façon aléatoire.

Couvrir les récipients comme indiqué en 6.1.

Placer les récipients dans la pièce d'essai ou dans l'enceinte d'essai (6.3.1).

7.2.4 Détermination

Un jour après avoir ajouté les vers, répandre 5 g par récipient d'essai, de nourriture finement moulue séchée à l'air (5.3) sur la surface du sol et l'humidifier avec de l'eau potable (environ 5 ml à 6 ml par récipient). Nourrir les vers une fois par semaine pendant la période d'essai. Si la consommation de nourriture est faible, réduire au minimum l'apport en nourriture. Pour chaque récipient d'essai, relever le comportement alimentaire et la quantité de nourriture apportée pendant la durée de l'essai.

Maintenir constante la teneur en eau du substrat de sol dans les récipients d'essai pendant toute la durée de l'essai, en pesant les récipients d'essai à intervalles réguliers, et en rajoutant de l'eau si nécessaire. À la fin de l'essai, la teneur en eau ne doit pas s'écarter de plus de 10 % de celle mesurée au début de l'essai.

Garder les vers adultes pendant quatre semaines dans le substrat d'essai. À la fin de cette période, retirer les adultes et pour chaque récipient, noter le nombre et la masse totale des vers de terre adultes vivants. Garder les récipients d'essai pendant quatre autres semaines dans l'environnement d'essai (6.3) pour permettre aux larves de se développer. Au début de cette période, les larves reçoivent une fois 5 g de nourriture par récipient mélangés manuellement avec le substrat. Au terme de cette période, compter, par une méthode appropriée, le nombre de larves écloses des cocons, par récipient d'essai.

NOTE L'annexe B donne des exemples pour illustrer deux méthodes appropriées, l'une d'elles permettant le comptage des cocons.

7.3 Substance de référence

Utiliser la carbendazime comme substance de référence. Si le composé est mélangé dans le substrat, les effets sur la reproduction ($\alpha = 0,05$) doivent être observés à des concentrations comprises entre 1 mg et 5 mg ai de carbendazime par kilogramme de masse sèche de substrat. (Pour les applications en surface, voir l'annexe D).

8 Calcul et expression des résultats

8.1 Calcul

Déterminer, pour chaque concentration, le pourcentage de mortalité et le pourcentage d'augmentation ou de perte de biomasse des adultes ainsi que le nombre des larves produites au cours de l'essai définitif.

Comparer les moyennes par des méthodes statistiques appropriées par exemple, Williams, Dunnett ou le test t de Student et évaluer la signification ($\alpha = 0,05$) des écarts constatés par rapport au(x) témoin(s).

8.2 Expression des résultats

Indiquer, en milligrammes par kilogramme de masse sèche de substrat de sol, la plus forte concentration expérimentée ne causant ni mortalité, ni changement significatif dans la biomasse des adultes, ni aucune réduction notable du nombre des larves (NOEC) ainsi que la concentration la plus faible produisant des effets observables (LOEC) et si possible la CL/CE50.

9 Validité de l'essai

Les résultats sont considérés comme valides si :

- a) le taux de production de larves est d'au moins 30 par récipient témoin;
- b) le coefficient de variance de la reproduction dans le témoin est inférieur ou égal à 30 %;
- c) le pourcentage de mortalité des adultes observé dans le(s) témoin(s) est inférieur ou égal à 10 %.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit faire référence à la présente partie de l'ISO 11268. Outre les résultats exprimés conformément à 8.2, il doit comporter les indications suivantes :

- la description détaillée de la substance d'essai et les informations relatives aux propriétés chimiques et physiques si elles facilitent l'interprétation des résultats d'essai ;
- la description complète du réactif biologique utilisé (espèce, âge, gamme de masses, conditions d'élevage, fournisseur) ;
- la méthode de préparation du substrat d'essai, et toute substance ou méthode auxiliaire utilisée pour les substances non solubles ou peu solubles dans l'eau ;
- les résultats obtenus avec la substance de référence, le cas échéant ;
- les conditions détaillées de l'environnement de l'essai ;
- un tableau indiquant le pourcentage de mortalité obtenu dans chaque récipient, pour chaque concentration et pour le témoin ;
- la masse de vers vivants adultes au début de l'essai et la masse totale de vers survivants par récipient d'essai après 4 semaines ;
- le nombre de larves par récipient d'essai, à la fin de l'essai ;
- la plus forte concentration ne causant aucun effet observé (NOEC) ainsi que la concentration la plus faible produisant des effets (LOEC) ;
- la description des symptômes évidents ou pathologiques, ou des modifications sensibles du comportement (par exemple, une diminution de l'activité alimentaire), observés sur les organismes d'essai pour chaque récipient d'essai ;